

A microscopic image of several cells, likely fibroblasts, stained with a red dye (possibly DAPI or a similar nuclear stain) and a blue dye (possibly a cytoplasmic or extracellular matrix stain). The cells are irregular in shape and have prominent nuclei. The background is a light blue color.

Claudia Susana Reste Florindo

**Estudo dos genes humanos tipo Mob:
hsMob4A e hsMob4B**

Dissertação apresentada para a obtenção do
Grau de Doutor em Biologia,
especialidade Genética Molecular
pela Universidade Nova de Lisboa,
Faculdade de Ciências e Tecnologia.

Lisboa
2004

N.º de arquivo:

Copyright:

Claudia Susana Reste Florindo

**Estudo dos genes humanos tipo MOB,
hsMob4A e hsMob4B.**

**Dissertação apresentada para a obtenção do
grau de Doutor em Biologia,
especialidade Genética Molecular
pela Universidade Nova de Lisboa,
Faculdade de Ciências e Tecnologia.**

**Lisboa
2004**

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em particular:

Ao Doutor Álvaro Tavares, o meu orientador de doutoramento, gostaria de agradecer a excelente orientação, onde se destaca a constante exigência, um sem número de ideias científicas (que para as realizar todas talvez aos 100 anos eu pudesse entregar a tese), e por último o enorme entusiasmo e paixão que tem pela ciência. Gostaria ainda de dizer que, de facto, a anedota do coelho é a pior anedota que já ouvi na minha vida.

I would like to thank to Dr Jonathon Pines for generously welcome me in his lab for a short period. I'm grateful for the excellent teaching in live cell imaging, the strong support and, above all, the enormous patience to always listen my weekly reports. In particular, I would like to thank him for being such a friend; it was a real pleasure to work with him.

To all the people in Jon Pines's Lab, for making my stay in Cambridge so pleasant, and for being available to help me at all times (and they where so many...). I specially like to thank Anja (for the very nice welcome), Cath (for the cinemas) and Lorry (for the injections in the early morning).

À Doutora Isabel Barahona, por ter tido a coragem de me empurrar em frente numa altura difícil da minha vida, que foi o início do doutoramento.

À Joana Perdigão pela ajuda preciosa na imunolocalização da hsMob4.

Aos Dr Rui Gomes (Faculdade de Ciências de Lisboa) e Dr Domingos Henrique (Faculdade de Medicina de Lisboa) por me terem permitido utilizar os microscópios nos ensaios de imunolocalização.

À Fundação Para a Ciência e Tecnologia pela bolsa de Doutoramento.

Ao Instituto Gulbenkian de Ciência onde realizei quase todo o trabalho prático, pela qualidade da instituição e pela simpatia de todos os funcionários.

Aos meus colegas do grupo da mitose, pela ajuda que tive no dia a dia. Em especial gostaria de agradecer à Vânia e à Mariana. À Vânia gostaria de agradecer a boa disposição e a constante alegria, que fez com que fosse um prazer ter trabalhado com ela. À Mariana, gostaria de agradecer as discussões científicas, a amizade, e a capacidade de discordar comigo (no entanto, também não precisas de discordar tantas vezes...).

Às minhas revisoras gráficas da tese, a Joana, a Estela, a Mariana e a Margarida. Muito obrigada, não tenho palavras para agradecer a vossa amizade e apoio. Espero um dia poder retribuir.

À Joana gostaria de agradecer ainda a companhia nos fins-de-semana e os cafés, onde era sempre possível discutir trabalho e rir um pouco.

Às meninas, a Patrícia e a Sofia, porque é sempre bom trabalhar num Instituto onde há pessoas tão alegres, bem dispostas e que joguem volley de praia.

À Renata, minha amiga de longa data, pelo apoio que me deu enquanto eu estive em Cambridge (e não só).

Gostaria de agradecer a todos os meus amigos e familiares, pelo constante apoio e por terem compreendido as minhas ausências. Em particular, gostaria de agradecer à minha madrinha a Emília, por me ter estimulado desde sempre o gosto pela ciência.

Gostaria de agradecer à Palmira, por ter sido uma segunda mãe para mim, por ser tão minha amiga.

À Maria, o mais recente membro da minha família, porque me enche de alegria estar perto dela e por ter sido a única pessoa que quis que eu explicasse o meu poster duas vezes.

Aos meus irmãos e cunhados (também irmãos), pela amizade e sinceridade (às vezes desconcertante) que só existe entre irmãos. Gostaria de agradecer especialmente pela sensação de segurança que tenho por vos ter como irmãos, pois sei que se tiver algum problema, o “Clã” corre todo para me defender.

Aos meus pais, pelo constante apoio e compreensão, por me incentivarem sempre a fazer o que me faz mais feliz. É de facto fantástico que tenham tido sempre paciência de ouvir as minhas histórias, e que a minha mãe até já saiba o que é um centrossoma.

E a todos aqueles que sempre me acompanharam, mas que me é impossível nomear todos.



Claudia Susana Reste Florindo

**Caracterização da função dos genes humanos
hsMob4 (A e B) no ciclo celular**

RESUMOS: Português, Inglês e Francês

Dissertação apresentada para a obtenção do
Grau de Doutor em Biologia,
especialidade Genética Molecular
pela Universidade Nova de Lisboa,
Faculdade de Ciências e Tecnologia.

**Lisboa
2004**

Resumo

A saída da célula da fase de mitose e a citocinese são processos que necessitam de ser regulados e coordenados de modo a que a viabilidade celular se mantenha. Na levedura *S. cerevisiae* esta regulação parece ser executada por uma via de sinalização denominada Mitotic Exit Network (MEN). Embora uma via semelhante (Septation Initiation Network - SIN) tenha sido descrita noutra levedura (*Schizosaccharomyces pombe*), em eucariotas superiores os mecanismos moleculares que determinam a clivagem entre células no final da mitose permanecem ainda desconhecidos. Neste projecto procurámos identificar moléculas envolvidas nesse processo. Estudou-se em particular, a função dos genes tipo *MOB1* em células humanas. O gene *MOB1* de *S. cerevisiae* é um componente da MEN e tem uma função essencial. Leveduras mutantes em *MOB1* (nos quais a função da proteína é inactivada) são incapazes de sair de mitose e completar a citocinese.

Isolámos e clonámos os genes que codificam para proteínas tipo Mob1, tendo sido identificados sete genes humanos tipo *MOB1*. Focámos o nosso estudo em dois deles, os genes *hsMob4A* e *hsMob4B*, uma vez que são os que apresentam maior homologia ao *MOB1* de levedura. A imunolocalização das *hsMob4* revelou que estas proteínas se acumulam nos centrossomas durante todo o ciclo celular mas que em telófase, quando os centríolos se separam, ficam apenas associadas ao centríolo mãe. Um silenciamento simultâneo de ambos os genes (por RNAi), resulta em falhas graves de citocinese, na separação dos centríolos e na formação de células binucleadas. Observa-se também, e surpreendentemente, um ganho de mobilidade celular. É de salientar que em alguns casos, células deplectadas em *Mob4*, após a divisão e sem que ocorresse citocinese, prosseguiram o ciclo celular ainda que ligadas, originando cadeias de células interligadas. Este resultado indica que as Mobs não são necessárias para a saída de mitose e progressão pelo ciclo celular, mas que no entanto são importantes para a clivagem celular.

A depleção independente de *hsMob4A* e de *hsMob4B* revelou que ambas as proteínas são necessárias para a clivagem e para a mobilidade celular. No entanto, a intensidade dos efeitos observados é diferente, sugerindo funções ligeiramente diferentes/especializadas para cada uma. Esta aparente diferença de função foi igualmente observada em ensaios de sobreexpressão.

Os resultados finais obtidos permitem concluir que as proteínas humanas *hsMob4A* e *hsMob4B* são importantes para a execução temporalmente correcta da citocinese. Propõe-se ainda que estas duas proteínas possam actuar de uma forma coordenada, assegurando a *hsMob4B* a orientação do centríolo e a *hsMob4A* promovendo a sinalização da clivagem celular.

Summary

The identification of the molecules responsible for the control of cytokinesis is a major topic of study of the cell cycle. Two signalling cascades, Mitotic Exit Network (MEN, in *Saccharomyces cerevisiae*) and Septation Initiation Network (SIN, in *Schizosaccharomyces pombe*), were shown to be essential for correct cytokinesis to occur. In higher eukaryotes the control of this cellular process is still unknown, although the mother centriole has been directly implicated in triggering cytokinesis. Mob1 is one of the proteins that belong to MEN (scMob1) and SIN (spMob1) whose function is largely unknown. *ScMOB1* is an essential gene in which mutations (that inactivate the gene function) cause an arrest in late anaphase, with an elongated spindle and segregated DNA, indicating a failure in cytokinesis.

We have isolated and cloned seven different genes encoding for scMob1-like proteins in human cells, and we have focused our work on two of these genes: hsMob4A and hsMob4B. We have determined the intracellular localisation of the human Mob-like proteins by indirect immunofluorescence and found that hsMob4 is a centrosomal protein throughout the cell cycle. Interestingly, the proteins seem to accumulate between the two centrioles until telophase, when they become associated only with the mother centriole. Silencing of hsMob4A and hsMob4B by RNAi induces cytokinesis failure by a mechanism in which the cells stay connected by long intercellular bridges, centriole separation and cell movement. These cells proceed to the next cell cycle without abscission, forming multicellular syncytia.

Independent silencing of hsMob4B and hsMob4A revealed that, although both proteins are required for centriole cohesion, cell movement and cytokinesis, they are so to different functional levels. HsMob4B depletion resulted mainly in centriole separation, whereas hsMob4A depletion caused mainly an increase in the number of binucleated cells. Different effects were also observed upon overexpression of hsMob4A and hsMob4B.

We conclude that hsMob4A and hsMob4B are necessary for cytokinesis in mammalian cells, probably for the final cleavage event. We propose that these two proteins act in a coordinated process, where hsMob4B keeps centriole orientation in telophase cells and hsMob4A promotes the cleavage signalling.

Resumé

L'identification des molécules responsables du contrôle de la cytokinèse est une question majeure de l'étude du cycle cellulaire. Deux voies de signalisation, Mitotic Exit Network (MEN, chez *Saccharomyces cerevisiae*) et Septation Initiation Network (SIN, chez *Schizosaccharomyces pombe*), ont été démontré comme étant essentielle pour que la cytokinèse se déroule correctement. Chez les eukaryotes supérieur, le centriole mère est impliqué directement dans le déclenchement de la cytokinèse. En revanche, le contrôle de ce processus cellulaire est encore inconnu. Mob1 est l'une des protéines qui appartient aux voies de signalisation MEN (scMob1) et SIN (SpMob1) dont la fonction est encore obscure. *ScMOB1* est un gène essentiel dont la mutation (perte de fonction) provoque l'arrêt de la division cellulaire en fin d'anaphase, caractérisé par un fuseau mitotique allongé et un ADN isolé, indiquant l'échec de la division cellulaire.

Nous avons identifié et cloné à partir de cellules humaines, sept gènes indépendant qui codent pour des protéines analogues à scMob-1 et nous avons concentré notre travail sur deux de ces gènes: hsMob4A et hsMob4B. Nous avons déterminé la localisation intracellulaire des protéines de la famille Mob chez l'homme par immunofluorescence indirecte et découvert que hsMob4 sont des protéines centrosomales tout au long du cycle cellulaire. De manière intéressante, ces protéines semblent s'accumuler entre les deux centrioles jusqu'en télophase, où elles deviennent alors associées uniquement avec le centriole mère. Une réduction de l'expression de hsMob4A et de hsMob4B par RNAi empêche la division cellulaire complète par un mécanisme où les cellules restent connectées par de longs ponts cytoplasmiques, où les centrioles se séparent et où les cellules acquièrent une plus grande mobilité. Ces cellules continuent à se diviser sans scission complète, formant alors un syncytium multicellulaire.

Une réduction de l'expression de hsMob4A et de hsMob4B indépendamment l'une de l'autre révèle que, bien que ces deux protéines soient requises pour la cohésion des centrioles, leur rôle sur le contrôle du mouvement cellulaire et de la scission cellulaire est différent. Une réduction de l'expression de hsMob4 conduit principalement à une augmentation du nombre de cellules binucléées. Des effets différents ont également été observés après surexpression de hsMob4A et hsMob4B.

Nos résultats nous amènent à conclure que hsMob4A et hsMob4B sont nécessaires pour la cytokinèse dans les cellules de mammifères, probablement pour l'étape finale de division. Nous proposons que ces deux protéines agissent dans un processus coordonné, où hsMob4B maintient l'orientation du centriole dans des cellules en télophase et hsMob4A induit le signal de scission.

Índice de Matérias

1. Introdução	1
1.1 A mitose	2
1.1.1 O ciclo celular	2
1.1.2 A mitose	3
1.2 Os microtúbulos em mitose	3
1.2.1 Os microtúbulos	3
1.2.2 Os microtúbulos em mitose	4
1.3 Entrada em mitose	5
1.4 A transição metafase-anáfase	7
1.4.1 O ponto-de-controlo de montagem do fuso	7
1.4.2 O APC (Anáfase Promoting Complex).....	8
1.4.3 Os inibidores de anáfase	9
1.4.4 A regulação do APC.....	9
1.5 A citocinese	10
1.5.1 A definição do local de divisão	12
1.5.2 A formação do anel de actomiosina	14
1.5.2.1 As proteínas de Miosina tipo II	15
1.5.2.2 As Septinas	15
1.5.2.3 As proteínas tipo Cdc15	16
1.5.2.4 As proteínas tipo IQGAP	16
1.5.2.5 As GTPases de baixo peso molecular.....	17
1.5.2.6 As forminas	18
1.5.2.7 A ordem de <i>montagem</i> dos componentes do anel de actomiosina	19
1.5.3 A formação do sulco de clivagem em células animais	20
1.5.3.1 As proteínas passageiras dos cromossomas	20
1.5.3.2 As proteínas motoras	22
1.5.4 A finalização da citocinese	23
1.6 A coordenação da mitose com a citocinese	23
1.6.1 A MEN (Mitotic Exit Network)	23
1.6.2 A regulação de MEN	25
1.6.3 A cadeia de sinalização FEAR	27
1.6.4 A coordenação entre a saída de mitose e a citocinese.....	28
1.6.5 A SIN (Septation Initiation Network)	29
1.6.6 Regulação de SIN	31
1.6.7 SIN e MEN, diferenças e semelhanças	31
1.7 Os genes Mob	33
1.7.1 Mob1 de <i>S. cerevisiae</i>	33
1.7.2 Mob1 de <i>S. pombe</i>	34
1.7.3 Mob2 de <i>S. cerevisiae</i>	34
1.7.4 Mob2 de <i>S. pombe</i>	35
1.7.5 A função do genes Mob	36
1.7.6 Os homólogos dos genes Mob em eucariotas superiores	36
1.7.6.1 Os genes Mob humanos	36
1.8 Existe uma cascata semelhante a MEN e SIN em eucariotas superiores?	37
1.8.1 Os homólogos a MEN e SIN em eucariotas superiores.....	37
1.8.1.1 As fosfatases tipo Cdc14	37

1.8.1.2 As cinases tipo Dbf2	38
1.8.1.3 As proteínas tipo Nud1	40
1.9. O centrossoma e a citocinese.....	40
1.9.1 O centrossoma	40
1.9.2 O centrossoma e a citocinese	41
1.10 A técnica de RNAi (RNA Interference)	43
 2. Materiais e Métodos	47
2.1 Material Biológico	48
2.1.1 Estirpes bacterianas	48
2.1.2 Linhas celulares de mamíferos	48
2.1.3 Vectores	48
2.1.4 cDNAs dos Mobs humanos	49
2.1.5 Oligonucleotídeos DNA e RNA	49
2.1.6 Anticorpos	52
2.2 Técnicas variadas	52
2.2.1 Preparação de RNA	53
2.2.2 PCR	53
2.2.3 RT-PCR	53
2.2.4 Géis de proteínas e Western Blots	54
2.2.4.1 Géis de proteínas (SDS-PAGE).....	54
2.2.4.2 Western Blots	54
2.2.5 Expressão heteróloga de proteínas em <i>E. coli</i>	55
2.2.6 Imunopurificação de Anticorpos	55
2.3 Manipulação de células de mamíferos	56
2.3.1 Sincronização de células	56
2.3.2 Ensaio de renucleação de microtúbulos	56
2.3.3 Transfecções de DNA plasmídico	57
2.3.4 Análise de viabilidade celular após a sobreexpressão de hsMob4.....	58
2.4 A técnica de RNAi	58
2.4.1 Emparelhamento dos oligos	58
2.4.2 Transfecção do duplex de siRNA	59
2.5 Técnicas citológicas	61
2.5.1 Imunofluorescência	61
2.5.1.1 Fixação com Metanol	61
2.5.1.2 Fixação com Metanol/Acetona	62
2.5.1.3 Fixação com Formaldeído ou Paraformaldeído	62
2.5.1.4 Fixação com Formaldeído após pré-extracção	63
2.5.1.5 Fixação com gluteroaldeído	63
2.5.2 Microscopia de tempo real	63
 Resultados	65
 3. A família das proteínas tipo Mob	67
3.1 As proteínas tipo Mob1	69
3.2 As proteínas tipo Mob1 humanas (hsMobs)	71
3.2.1 A proteína hsMob1	71

3.2.2 A proteína hsMob2	73
3.2.3 A proteína hsMob3	74
3.2.4 A proteína hsMob4	79
3.3 Discussão	81
4. Caracterização celular de hsMob4	87
4.1 Validação do anticorpo anti-hsMob4.....	88
4.2 Estabilidade da proteína hsMob4.....	91
4.3 Localização celular de hsMob4.....	93
4.3.1 Localização celular de proteínas de fusão hsMob4A e hsMob4B.....	93
4.3.2 Imunolocalização intracelular de hsMob4.....	98
4.4 Discussão.....	104
5. Ensaios de RNAi duplo	107
5.1 Silenciamento induzido pelo RNAi	108
5.2 Depleção de hsMob4: análise em células fixas	111
5.3 Depleção de hsMob4: análise de microscopia <i>in vivo</i>	119
5.4 A depleção de hsMob4(A&B) causa mobilidade celular	133
5.5 Discussão	137
5.6 Legendas dos filmes.....	142
6. Análise dos efeitos de sobreexpressão de hsMob4A e hsMob4B	143
6.1 Imunofluorescência em células fixas.....	144
6.1.1 Progressão do ciclo celular após sobreexpressão de hsMob4A ou hsMob4B.....	144
6.1.2 Fenótipo causado pela sobreexpressão de hsMob4A e hsMob4B....	147
6.1.3 Efeitos da sobreexpressão nos centríolos	152
6.1.4 Efeitos nos centrossomas.....	153
6.1.5 - Ensaios de renucleação de microtúbulos.....	155
6.2 Efeitos de sobreexpressão em microscopia de tempo real.....	159
6.3 Discussão.....	164
6.4 Legendas dos filmes.....	167
7. RNAi simples de hsMob4A e hsMob4B	169
7.1 Análise de células fixas.....	170
7.2 Análise em microscopia de tempo real.....	172
7.3 Depleção de hsMob4A e hsMob4B: análise do movimento celular.....	175
7.4 Discussão.....	178
8. Discussão	181
8.1 As hsMob4 como promotoras dos eventos finais da citocinese	182

8.2 As hsMob4 e o movimento celular	184
8.3 Possíveis parceiros moleculares de hsMob4	185
8.4 Funções celulares diferentes para hsMob4A e hsMob4B?	186
 9. Perspectivas	 189
 10. Bibliografia	 193
 11. Apêndices	 207
11.1 Apêndice 1: Comparação entre as proteínas Mob1 de <i>S. cerevisiae</i> , hsMob4A e hsMob4B	208
11.2 Apêndice 2: hsMob1 e hsMob3.....	209
11.2.1 hsMob1.....	209
11.2.2 hsMob3.....	213
11.3 Apêndice 3: Clones	216
11.4 Apêndice 4: Valores dos gráficos apresentados nos capítulos de resultados.....	220

Índice de Figuras

1. Introdução

1.1 Representação esquemática das quatro fases do ciclo celular: G1, S, G2 e M	3
1.2 Mecanismos gerais da citocinese em eucariotas.....	12
1.3 Modelos que explicam como aparelho mitótico define a posição do sulco de clivagem em células animais.....	14
1.4 Mecanismo da cascata de sinalização que promove a saída de Mitose em <i>S. cerevisiae</i> , MEN.....	26
1.5 Representação esquemática da estrutura do centróssoma.....	42
1.6 Ciclo de duplicação dos centróssomas.....	42
1.7 O centríolo mãe como promotor da citocinese em eucariotas superiores....	43
1.8 Mecanismo de acção do RNA interference.....	44

3. A família das proteínas tipo Mob

3.1 Alinhamento proteínas tipo hsMob4 de diversos organismos.....	69
3.2 Árvore filogenética das distâncias relativas entre as diferentes proteínas tipo Mob de <i>H. sapiens</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> e <i>D. Melanogaster</i>	70
3.3 Mapa genómico de hsMob1	72
3.4 cDNA de HsMob1	72
3.5 Mapa genómico de hsMob2	74
3.6 Região codificante de hsMob2	74
3.7 Alinhamento da subfamília de proteínas de hsMob3 (hsMob3A, B e C).....	75
3.8 Alinhamento da região codificante das sequências das diferentes hsMob3 humanas.....	76
3.9 Mapa genómico de hsMob3A, B e C	77
3.10 As proteínas tipo hsMob3.....	78
3.11 Comparação das sequências de aminoácidos de hsMob4B e hsMob4A.	79
3.12 Alinhamento das sequências das regiões codificantes de hsMob4A e hsMob4B	80
3.13 Mapa genómico de hsMob4A e hsMob4B	81
3.14 cDNA de hsMob4A	82
3.15 Região codificante de hsMob4B.....	82

4. Caracterização celular de hsMob4

4.1 Comparação das sequência polipeptídicas das proteínas Xmob1, hsMob4A e hsMob4B	89
4.2 Análise por Western Blot do soro anti-Mob4 completo, soro imunodeplectado e soro inumopurificado	89
4.3 O anticorpo anti-Mob4 reconhece hsMob4A e hsMob4B em Western Blot .	91
4.4 Análise dos níveis de proteína hsMob4 ao longo do ciclo celular.....	92
4.5 Localização de RFP em células swiss 3T3	94

4.6 Localização de RFP _{hsMob4A} em células swiss 3T3	95
4.7 Localização de YFP em células HeLa	96
4.8 Localização das proteína de fusão YFP. _{hsMob4A}	97
4.9 Localização das proteína de fusão YFP. _{hsMob4B}	98
4.10 Localização de _{hsMob4} durante mitose em células HeLa	99
4.11 Localização de _{hsMob4} em telofase e início de interfase	100
4.12 Modelo da indução de citocinese provocada pelo centríolo mãe em células de mamíferos	101
4.13 Localização de _{hsMob4} em células HeLa-centrina	102
4.14 Localização de _{hsMob4} em células HeLa-centrina, durante a metafase, anafase e telofase tardia	103
4.15 Modelo para localização de _{hsMob4} nos centrossomas	104

5. Ensaios de RNAi duplo

5.1 Homologia entre as sequências dos cDNAs e dos oligos de _{hsMob4A} e de _{hsMob4B}	109
5.2 Depleção dos níveis endógenos de _{hsMob4(A&B)} após RNAi. Western Blot das células transfectadas com oligos contra a Lâmina A/C e contra _{hsMob4(A&B)}	113
5.3 Foto representativa das distâncias de separação de centríolos observadas após RNAi.....	113
5.4 Percentagem de células com dois centríolos separados após RNAi de _{hsMob4(A&B)}	114
5.5 Intervalos de separação observados entre os dois centríolos no RNAi de _{hsMob4(A&B)}	114
5.6 Depleção de _{hsMob4(A&B)} causa falhas em citocinese.....	116
5.7 A depleção de _{hsMob4(A&B)} causa defeitos de citocinese: formação de citoplastos na vizinhança de células binucleadas.....	117
5.8 A depleção de _{hsMob4(A&B)} causa defeitos de citocinese: formação de cadeias de células.....	118
5.9 Possíveis mecanismos para a formação das cadeias de células e das células binucleadas após RNAi de _{hsMob4(A&B)}	119
5.10 Intervalos de tempo de telofase até citocinese após depleção de _{hsMob4(A&B)}	122
5.11 Após depleção de _{hsMob4(A&B)} as células mantêm-se ligadas por pontes intracelulares muito longas.....	123
5.12 Algumas células binucleadas formam-se por reversão do sulco de clivagem.....	125
5.13 Pontes intracelulares longas não provocam reversão do sulco de clivagem.....	126
5.14 Erros de clivagem após RNAi de _{hsMob4(A&B)}	128
5.15 15 % das células binucleadas totais formam-se devido à depleção de _{hsMob4(A&B)} surgem de erros de clivagem.....	129
5.16 31 % das células binucleadas totais formam-se por erros na segregação do DNA.....	130
5.17 31 % das células binucleadas totais formam-se por erros na segregação do DNA.....	131
5.18 A depleção de _{hsMob4(A&B)} causa erros na segregação do DNA.....	131
5.19 A depleção de _{hsMob4(A&B)} causa a formação de sulcos de clivagem extra.....	132
5.20 A depleção de _{hsMob4(A&B)} provoca mobilidade celular.....	134
5.21 A depleção de _{hsMob4(A&B)} induz movimento celular.....	135
5.22 A depleção de _{hsMob4(A&B)} causa uma constante mudança no sentido	

do movimento das células.	136
6. Análise dos efeitos de sobreexpressão de hsMob4A e hsMob4B	
6.1 Proliferação de células a sobreexpressar YFP.hsMob4A e YFP.hsMob4B..	145
6.2 Proliferação de células HeLa quando sobreexpressam hsMob4A e hsMob4B.....	146
6.3 A sobreexpressão de hsMob4A e de hsMob4B induz apoptose.....	148
6.4 A sobreexpressão de hsMob4A e de hsMob4B induz apoptose.....	149
6.5 A sobreexpressão de hsMob4A e de hsMob4B provoca um aumento no número de células binucleadas.....	150
6.6 A sobreexpressão de hsMob4A e de hsMob4B provoca um aumento no número de células binucleadas.....	151
6.7 A sobreexpressão de hsMob4A e de hsMob4B provoca defeitos de citocinese.....	152
6.8 A sobreexpressão de hsMob4A ou de hsMob4B impede a separação dos centríolos no final de telofase.	153
6.9 A sobreexpressão de hsMob4A e de hsMob4B parece provocar defeitos no recrutamento de γ -tubulina para os centrossomas em células 3T3.....	155
6.10 A sobreexpressão de hsMob4A aumenta a estabilidade dos microtúbulos.....	156
6.11 A sobreexpressão de hsMob4 (A ou B) induz a formação de locais de nucleação de microtúbulo.....	158
6.12 A sobreexpressão de hsMob4A causa um bloqueio em metafase.....	161
6.13 A sobreexpressão de hsMob4B provoca o colapso do fuso mitótico.....	162
6.14 A sobreexpressão de hsMob4B e de hsMob4A causa agregação da α -tubulina.....	163
7. RNAi simples de hsMob4A e hsMob4B	
7.1 Fenótipo causado por RNAi de hsMob4A ou hsMob4B – células binucleadas.....	171
7.2 Fenótipo causado por RNAi de hsMob4A ou hsMob4B – separação de centríolos.....	171
7.3 Análise em microscopia “in vivo” da depleção simples de hsMob4A e hsMob4B: intervalos desde o início de telofase até à citocinese.....	173
7.4 A depleção de hsMob4A e de hsMob4B provoca variação no sentido do movimento das células.....	177
7.5 A depleção de hsMob4A e de hsMob4B aumenta instantânea das células.	178
8. Discussão	
8.1 Estrutura tridimensional de hsMob4B	188
11. Apêndices	
11.1 Alinhamento entre as sequências das proteínas hsMob4A, hsMob4B e scMob1.....	208

11.2 Representação esquemática da proteína hsMob1- Δ N que se injectou no coelho para produzir anticorpos.....	210
11.3 O soro produzido contra hsMob1 reconhece as proteínas hsMob1 e Dmob1 produzidas em bactéria.....	210
11.4 A sobreexpressão de YFP.hsMob1 causa morte celular em células HeLa e em células Hep-2.....	211
11.5 A sobreexpressão da proteína de fusão YFP.hsMob1 em células HeLa afecta a cariocinese.....	212
11.7 Detecção de hsMob3 em células HeLa.....	213
11.8 Detecção de hsMob3 por imunofluorescência durante a mitose.....	214
11.9 Detecção de hsMob3 em células HeLa.....	215

Índice de tabelas

1. Introdução

1.1 Componentes das cascatas de sinalização MEN e SIN e os homólogos já identificados em eucariotas superiores.....	32
---	----

2. Materiais e Métodos

2.1 Genótipo das estirpes de <i>Escherichia coli</i> utilizadas	48
2.2 Condições de subcultura das células de mamíferos	48
2.3 Vectores utilizados	49
2.4 Oligonucleotídeos de DNA	51
2.5 Oligonucleotídeos de siRNA	51
2.6 Anticorpos primários utilizados	52
2.7 Anticorpos secundários utilizados.....	52

3. A família das proteínas tipo Mob

3.1 Percentagem de identidade existente entre as diferentes proteínas tipo Mob de <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> e <i>H. sapiens</i>	71
3.2 Comparação entre as diferentes proteínas tipo hsMob3 humanas	75

5. Ensaios de RNAi duplo

5.1 Análise da eficiência dos oligos na indução da depleção das proteínas de fusão.....	110
5.2 Análise da eficiência dos oligos na indução da depleção das proteínas de fusão.....	110
5.3 Duração de cada fase do ciclo celular após RNAi de hsMob4(A+B).....	121
5.4 Defeitos provocados pela depleção de hsMob4(A&B).....	123

6. Análise dos efeitos de sobreexpressão de hsMob4A e hsMob4B

6.1 A sobreexpressão de hsMob4A e de hsMob4B induz apoptose.....	149
6.2 Tempo de cada fase do ciclo celular em células a sobreexpressar hsMob4A ou hsMob4B.....	160
6.3 Defeitos mitóticos provocados pela sobreexpressão de hsMob4A ou hsMob4B.....	160

7. RNAi simples de hsMob4A e hsMob4B

7.1 Fenótipo causado por RNAi de hsMob4A ou hsMob4B (microscopia em tempo real)	172
7.2 Análise em microscopia “in vivo” da depleção simples de hsMob4A e hsMob4B: defeitos observados.....	174

11. Apêndices

11.1 Percentagem de identidade existente entre as proteínas hsMob4A e hsMob4B com a proteína scMob1 de <i>S. cerevisiae</i>	208
11.2 Percentagem de células com os centríolos separados (figura 5.4).....	220
11.3 Percentagem de células que se encontram com os referidos intervalos de separação de centríolos (figura 5.5)	220
11.4 Intervalos de tempo de telofase até citocinese (figura 5.10).....	220
11.5 Percentagem de células que variam o sentido de movimento após a depleção de hsMob4(A&B) (figura 5.22).....	221
11.6 A depleção de hsMob4A provoca um maior aumento de células binucleadas do que a depleção de hsMob4B, percentagem de células binucleadas (figura 7.1)	221
11.7 A depleção de hsMob4B provoca um maior aumento de células com os centríolos separados do que a depleção de hsMob4A, percentagem de com os centríolos separados (na figura 7.2.).....	221
11.8 Depleção simples: intervalos de tempo de telofase até citocinese (na figura 7.3 .).....	221
11.9 Percentagem de células que variam o sentido de movimento após a depleção de hsMob4A ou, hsMob4B (figura 7.4).....	222
11.10 A depleção de hsMob4A e de hsMob4B aumenta a velocidade instantânea das células (figura 7.5).....	222
11.11 Tabela com os valores apresentados de velocidade máxima e média observados para o RNAi controlo, hsMob4(A&B), hsMob4A e hsMob4B (capítulos 5 e 7).....	222

Índice de Filmes

5. Ensaios de RNAi duplo

5.1 Formação de células binucleadas por reversão do sulco de clivagem	142
5.2 Falhas de citocinese por formação de pontes intercelulares longas	142
5.3 Formação de um citoplasto e de uma célula binucleada	142
5.4 A depleção de hsMob4(A&B) induz mobilidade celular	142
5.5 As células controlo não apresentam movimento celular	142

6. Análise dos efeitos de sobreexpressão de hsMob4A e hsMob4B

6.1 Paragem em metafase numa célula a sobreexpressar hsMob4A.....	167
6.1.1 Paragem em metafase numa célula a sobreexpressar hsMob4A (DIC).....	167
6.1.2 Paragem em metafase numa célula a sobreexpressar hsMob4A (Fluorescência).....	167
6.2 Colapso dos fusos após a sobreexpressão de hsMob4B.....	167
6.3 Morte celular após falha de citocinese.....	167
6.3.1 Morte celular após falha de citocinese (DIC).....	167
6.3.2 Morte celular após falha de citocinese (Fluorescência).....	167

1.Introdução

Para que os organismos sobrevivam, têm que ser capazes de dividir as suas células, num processo de divisão celular designado mitose. Após a divisão, as células têm que se separar, e o processo pelo qual as células executam a separação física designa-se de citocinese. É essencial que a mitose se processe correctamente e que a citocinese apenas ocorra após a finalização da mitose. Erros nestes processos, assim como na coordenação entre ambos, são bastante deletérios podendo dar origem a morte celular (no caso de organismos unicelulares) e ao desenvolvimento de tumores (no caso de organismos multicelulares).

1.1 A mitose

1.1.1 O ciclo celular

O ciclo celular é o período de tempo entre a formação de uma célula, e a sua divisão em duas células filhas. É uma unidade de tempo fundamental ao nível celular, visto que define o ciclo de vida da célula. O ciclo celular divide-se em quatro fases: o período que antecede a síntese de DNA - fase G1, o período de síntese de DNA - fase S, o período que antecede a divisão celular- fase G2, e fase de divisão celular- fase M (mitose) (figura 1.1) . A progressão ordenada dos eventos do ciclo celular é garantida por mecanismos intrínsecos à célula, que asseguram a dependência de um evento do ciclo celular em relação ao seu precedente.

1.1.2 A mitose

A mitose pode ser dividida em quatro fases distintas de acordo com o movimento dos seus cromossomas (Figura 1.1), a profase, a metafase, a anafase e a telofase.

Em profase, a cromatina do núcleo inicia a condensação, o nucléolo desaparece e os centríolos começam a mover-se para polos opostos da célula e iniciam a formação do fuso mitótico. O início da *prometáfase* é definido como a fase do ciclo celular em que a membrana nuclear desaparece. A ligação de proteínas aos centrómeros¹ permite a formação dos cinetocoros². Os microtúbulos do fuso ligam-se aos cinetocoros e os cromossomas começam a mover-se para a zona equatorial da célula.

Em metafase, os cromossomas são todos alinhados no centro da célula formando a placa metafásica. Cada cromossoma encontra-se ligado a microtúbulos de cada polo do

¹ O centrómero é constituído por sequências de DNA altamente repetitivo, às quais se vão ligar proteínas específicas para se formarem os cinetocoros. Pensa-se que essas sequências são necessárias apenas para a eficiente formação dos cinetocoros.

² O cinetocoro é o conjunto do DNA centromérico e de proteínas que a este se associaram, que tem como função permitir a ligação dos microtúbulos do fuso mitótico aos cromossomas.

fuso, originando a orientação bipolar. Esta organização assegura, que quando os cromossomos são separados, cada célula filha receba uma cópia de cada cromossoma.

Em anafase dá-se a segregação dos cromossomos para os polos opostos da célula.

Em telofase os cromossomos já atingiram os polos da célula, o DNA descondensa e a membrana nuclear reforma-se. Os microtúbulos que constituem o fuso dispersam e dá-se a constrição da região mediana. Iniciam-se então os processos que irão dar origem à divisão das duas células filhas (citocinese). Simultaneamente as células filhas têm que voltar para um estado de interfase onde, entre outros eventos, se observa o reformar da membrana nuclear e a reestruturação dos microtúbulos do fuso mitótico numa rede de microtúbulos de interfase.

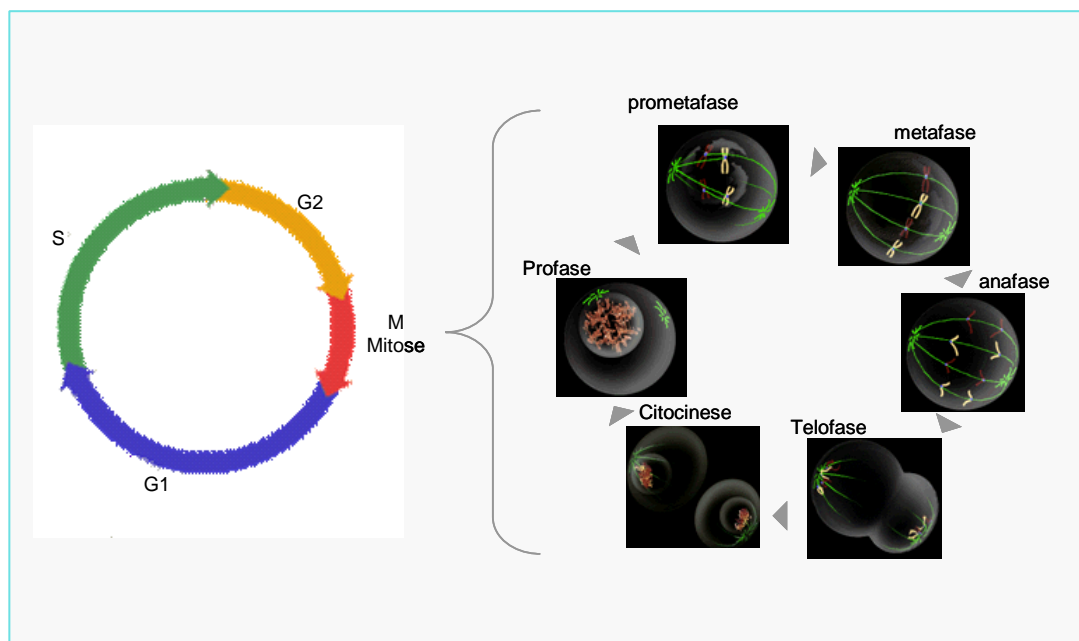


Figura 1.1 - Representação esquemática das quatro fases do ciclo celular: G1, S, G2 e M.

1.2 Os microtúbulos em mitose

1.2.1 Os microtúbulos

Os microtúbulos são componentes essenciais do citoesqueleto, e são constituídos por dímeros de $\alpha\beta$ tubulina. São estruturas dinâmicas, podendo alternar (*in vivo* e *in vitro*) entre estádios em que se encontram a crescer ou a encurtar. A essa capacidade de alternar entre estádios de polimerização e de despolimerização chama-se instabilidade dinâmica. Pelo facto de os microtúbulos terem uma instabilidade dinâmica, a probabilidade de

encontrarem os seus alvos no espaço tridimensional da célula é muito maior do que se tivessem uma polimerização estável (em equilíbrio) (revisto em Desai & Mitchison, 1997).

À transição entre um estado de polimerização para um estado de despolimerização dos microtúbulos chama-se catástrofe. A transição oposta, na qual os microtúbulos alternam de um estado de despolimerização para um estado de polimerização chama-se salvamento (revisto em Andersen & Wittmann, 2002).

1.2.2 Os microtúbulos em mitose

As proteínas que se associam aos microtúbulos designam-se de MAPs. A XMAP215 aumenta a capacidade de polimerização dos microtúbulos nas suas extremidades positivas. Esta proteína parece actuar controlando (diminuindo) a susceptibilidade das extremidades positivas dos microtúbulos à acção dos factores promotores de catástrofes (como por exemplo XKCM1). A alteração dos níveis de factores que afectam as propriedades dinâmicas dos microtúbulos tem uma influência determinante no fuso mitótico. Por exemplo, a deplecção da XMAP215 (ou a deplecção dos seus homólogos Msps em *D. Melanogaster*, e ZYG-9 em *C. elegans*) perturba a formação do fuso mitótico, e causa a formação de fusos muito pequenos (revisto em Andersen *et al.*, 2000). Contrariando estes efeitos, a inibição da XKCM1 reverte o feito da inibição parcial da XMAP215 (revisto em Wittmann *et al.*, 2001).

Uma outra proteína que afecta a dinâmica dos microtúbulos é a Op18/Statsmin. O aumento da concentração de Op18/statsmin não fosforilada (que é a sua forma activa) induz a formação de fusos mitóticos pequenos, causados provavelmente por um aumento nas frequências de catástrofe dos microtúbulos (revisto em Andersen *et al.*, 2000). A fosforilação da proteína Op18/statsmin pelo complexo Cdk1/CiclinaB causa a sua inactivação em mitose (Larson *et al.*, 1997). Assim como a Op18/Statsmin, a Xmap215 também é fosforilada em mitose e verificou-se que, pelo menos *in vitro*, é o complexo Cdk1/CiclinaB que a fosforila. Esta fosforilação diminui a capacidade da XMAP215 de promover a elongação dos microtúbulos (Vazquez *et al.*, 1999). As proteínas Op18/Statsmin e XMAP215 têm pois uma regulação que depende da fase do ciclo celular. Essa regulação poderá, pelo menos em parte, explicar a alteração da dinâmica dos microtúbulos em mitose relativamente aos microtúbulos em interfase.

Em mitose há duas modificações essenciais nos microtúbulos que permitem a ligação dos cromossomas ao fuso mitótico. Uma destas é a alteração do tempo de meia vida de um microtúbulo, que diminui de 10 minutos (em interfase) para 60 segundos (em mitose) (revisto em Compton, 2000), o que aumenta a sua instabilidade dinâmica. A outra é que os microtúbulos passam a ser organizados a partir de dois centros nucleadores, o que vai permitir a formação de um fuso mitótico bipolar. O fuso mitótico é constituído por um

conjunto de microtúbulos organizados de forma antiparalela, no qual as extremidades negativas dos microtúbulos estão próximas dos polos, e as extremidades positivas próximas dos cromossomas.

Assim que um microtúbulo é capturado por um cinetocoro, as proteínas do cinetocoro que se ligam aos microtúbulos estabilizam-nos, impedindo a sua despolimerização (revisto em Compton, 2000). Um microtúbulo que se encontre associado a um cinetocoro passa a ter um tempo de meia vida entre 5 a 9 minutos (revisto em Compton, 2000), que é já próximo de uma estabilidade semelhante aos microtúbulos de interfase. Essa alteração da dinâmica dos microtúbulos é essencial para que se forme a placa metafásica e, conseqüentemente para progressão por mitose. No caso de por exemplo, se dar uma sobreestabilização dos microtúbulos, esta poderá originar uma progressão mais lenta por mitose causando uma maior duração da profase e da metafase.

1.3 Entrada em mitose

A entrada em mitose é catalisada pela existência de elevados níveis de actividade de cinases, que são constituídas por uma unidade catalítica (CDK - Cyclin dependent kinase) e uma proteína activadora (a ciclina). As CDK mitótica é a CDK1, e a ciclina que se associa à CDK1 para promover entrada em mitose é a ciclina B. Assim que se dá esta activação a célula torna-se incapaz de impedir a sua entrada em mitose³. A Cdk1 encontra-se conservada no reino eucariótico e é também designada de Cdc2 ou p34^{cdc2} em *S. pombe*, e de Cdc28 em *S. cerevisiae*. O facto da cinase promotora de mitose se encontrar conservada no reino eucariótico sugere a existência de uma conservação para este mecanismo. E de facto, os processos fundamentais da bioquímica dos complexos ciclina-Cdk estão conservados desde a levedura ao homem.

Para além da ciclina B existe ainda uma outra ciclina, que se associa à CDK1 (e à CDK2), e cuja a função para a entrada em mitose ainda não está completamente esclarecida: a ciclinaA.

Em células de organismos vertebrados existem dois tipos de ciclinas A: a ciclina A1 e a ciclina A2. A ciclina A1 é expressa em células da linha germinal, em embriões em estado precoce (Howe *et al.*, 1995, Sweeney *et al.*, 1995) e em algumas linha celulares transformadas (Yang *et al.*, 1997). A ciclina A2 (também designada de ciclina A) é expressa em todas as células em proliferação, com a excepção de espermatozóides em divisão meiótica (Ravnik & Wolgemuth, 1999). A ciclina A tem o seu pico de expressão na transição

³ Existem ainda outros eventos necessários à sua activação: a fosforilação e desfosforilação de determinados resíduos de aminoácidos

G2/M, sendo degradada antes da ciclina B. A sua degradação inicia-se imediatamente após a quebra do envelope nuclear (den Elzen & Pines, 2001). Esta degradação é dependente do proteossoma 26S mas não do ponto-de-controlo⁴ de montagem do fuso (den Elzen & Pines, 2001). A expressão de uma forma não degradável da ciclina A induz uma paragem do ciclo celular em prometáfase, e as células são incapazes de formar uma placa metafásica estável (den Elzen & Pines, 2001). A função do complexo Cdk2/ciclina A em mitose é ainda obscura; pensa-se no entanto que este complexo poderá contribuir para a estabilização da ciclina B. Consistente com o papel desta ciclina como regulador do ciclo celular, observou-se que está sobreexpressa numa grande variedade de tumores (Yam *et al.*, 2002)

Em células humanas estão até hoje descritos três tipos de ciclinas B: ciclina B1, B2 e B3⁵. O mRNA que codifica para a ciclina B3 expresso em células da linha germinal (Nguyen *et al.*, 2002). O padrão de expressão desta ciclina sugere que esta seja necessária para a meiose, no entanto a sua função em células humanas é ainda desconhecida. As ciclinas B1 e B2 são expressas simultaneamente, mas têm localizações celulares diferentes. A ciclina B2 localiza-se no complexo de Golgi e no Retículo Endoplasmático, e este gene não é essencial em mamíferos, visto que ratinhos mutantes em ciclina B2 são viáveis (revisto em Pines, 1999). A localização da ciclina B2 poderá ser sugestiva de uma possível função para esta proteína na desagregação ordenada do Complexo de Golgi durante a mitose.

A ciclina mitótica por excelência é a ciclina B1. A actividade do complexo ciclina B1/Cdk1 é essencial para a entrada em mitose e este complexo é também designado por factor promotor de mitose ou MPF (M phase Promoting Factor). Sendo o MPF essencial para a entrada em mitose, não é pois surpreendente que o gene que codifica para a ciclina B1 seja essencial em mamíferos.

A ciclina B1 de mamíferos move-se entre o núcleo e o citoplasma, sendo translocada para o núcleo imediatamente antes da quebra do envelope nuclear (revisto em Pines, 1999). Durante a mitose (profase e metafase) esta ciclina/CDK associa-se com os cromossomas e ao aparelho mitótico (fuso e centrossomas) (Pines & Hunter, 1991), fosforilando um grande número de proteínas nesta fase do ciclo. Alguns dos alvos do complexo ciclina B/Cdk1 são por exemplo:

→ A fosforilação da caldesmolina, uma proteína que se liga à actina. A fosforilação da caldesmolina enfraquece a interacção caldesmolina-actina, permitindo a sua dissociação dos microfilamentos a facilitando desta forma o arredondamento da célula.

⁴ ponto-de-controlo - checkpoint

⁵ Em *Drosophila melanogaster* só foram descritas até agora as ciclinas B do tipo B1 e B3. Em *Xenopus Leavis* foram ainda descritas as ciclinas B4 e B5.

→ A fosforilação das subunidades da lamina, que resulta na quebra do envelope nuclear (revisto em Smits & Medema, 2001), e desta forma iniciando a prometáfase.

→ A fosforilação de Eg5. A Eg5 é uma cinesina motora que é necessária para a formação do fuso mitótico bipolar.

→ A fosforilação da proteína Op18/ Statsmin. A proteína Op18/ Statsmin é um regulador da dinâmica dos microtúbulos, e a sua fosforilação inibitória pelo complexo ciclina B/Cdk1 é essencial para a formação do fuso Larson et al, 1997).

Assim o complexo ciclinaB/Cdk1 actua a vários níveis na célula para despoletar a mitose (revisto em Smits & Medema, 2001).

1.4 A transição metafase-anáfase

A transição metafase-anáfase é um processo irreversível da mitose, uma vez iniciado a célula prossegue para anáfase e irá sair de mitose. Os cromátídeos irmãos que se encontram alinhados na placa metafásica são, nesta altura, segregados para as futuras células filhas. Não é difícil de imaginar que os erros que ocorram neste processo sejam deletérios para a progenia da célula.

Após a entrada em mitose (em profase e metafase) os cromossomas que se encontram ligados aos cinetocoros por microtúbulos do fuso mitótico sofrem forças de tensão. Estas forças de tensão são exercidas pelos microtúbulos do fuso, sendo direccionadas para promover a separação dos cromátídeos irmãos. No entanto, estas forças são contrabalançadas pela coesão existente entre os cromátídeos irmãos de cada cromossoma. Esta coesão impede a sua separação prematura (revisto em Farr & Cohen-Fix, 1999). Quando se dá a transição metafase-anáfase, a coesão existente entre os cromátídeos irmãos é destruída, o que permite que estes sejam segregados para os polos opostos da célula.

1.4.1 O ponto-de-controlo de montagem do fuso

Antes que se dê a transição metafase-anáfase a célula tem que assegurar a orientação bipolar de todos os cromossomas. O ponto-de-controlo de montagem do fuso impede que a separação dos cromátídeos irmãos se dê antes que todos estes tenham uma orientação bipolar no fuso mitótico. Na ausência de uma ligação bipolar de pelo menos um dos cinetocoros ao fuso mitótico, o ponto-de-controlo de montagem do fuso emite um sinal para não se iniciar a anáfase (*wait anaphase*).

O ponto-de-controlo de montagem do fuso é um mecanismo de sinalização cujo os componentes foram inicialmente identificados em rastreios em *S. pombe* e *S. cerevisiae*.

Estes rastreios deram origem à descoberta das proteínas Mad (Mad1, Mad2 Mad3), Bub (Bub1 e Bub3) e Mps1 (revisto em McIntosh *et al.*, 2002 e Musacchio & Hardwick, 2002).

Mas, como é que o ponto-de-controlo de montagem do fuso impede o início de anafase? Esta inibição dá-se através da proteína reguladora do APC, a Cdc20. As proteínas do ponto-de-controlo Mad2 e Mad3 inibem a formação do complexo APC^{Cdc20}, impedindo assim a degradação das securinas e, consequentemente, a separação dos cromátídeos irmãos e a anafase (revisto em McIntosh *et al.*, 2002 e Musacchio & Hardwick, 2002).

Uma vez estabelecida a orientação bipolar de todos os cromossomas, o ponto-de-controlo de montagem do fuso é inactivado. A célula pode agora iniciar a transição metafase-anafase e preparar-se para sair de mitose.

1.4.2 O APC (Anafase Promoting Complex)

A transição metafase-anafase é controlada por um processo de degradação, que garante a sua irreversibilidade. Esta degradação é mediada por poli-ubiquitinação das proteínas alvo. O processo de ubiquitinação envolve a ubiquitina que é transferida de uma enzima activadora da ubiquitina (E1), para a enzima que conjuga a ubiquitina (E2), e finalmente para o substrato (revisto em Farr & Cohen-Fix, 1999). A ubiquitina ligase (E3) medeia, a transferência final da ubiquitina para o substrato (revisto em Farr & Cohen-Fix, 1999). O APC (Anafase Promoting Complex) é um complexo proteico que tem a função de uma ubiquitina ligase (E3). Este complexo catalisa a formação das cadeias de poli-ubiquitina nas ciclinas mitóticas e noutras proteínas regulatórias da mitose, dirigindo-as para a degradação pelo proteossoma 26S (revisto em Peters, 1999).

Observou-se que a inactivação de diferentes subunidades do APC pode induzir uma paragem do ciclo celular em metafase. Devido a esta observação propôs-se existência de inibidores de anafase, que teriam que ser degradados para a progressão da mitose. Um dos candidatos a ser inibidor da anafase seria a ciclina B. No entanto verificou-se que, se se impedir a degradação da ciclina B (mutando a sua sequência consenso de destruição que é reconhecida pelo APC), não se observa uma paragem em metafase, mas sim uma paragem em anafase tardia (antes da saída de mitose) (revisto em Farr & Cohen-Fix, 1999). Estes resultados demonstraram que:

- a ciclina B1 não inibe a transição metafase-anafase
- a ciclina B1 impede a saída de mitose.

Assim, se a ciclina B não inibe a transição metafase-anafase, existirão outras proteínas celulares com essa função? Quais são essas proteínas e o seu mecanismo de acção?

1.4.3 Os inibidores de anafase

Em *S. cerevisiae* e em *S. pombe* foram identificadas respectivamente, as proteínas Pds1 e Cut2 como inibidores de anafase (Cohen-Fix et al., 1996; Funabiki *et al.*, 19996). Estas proteínas, pouco homólogas entre si, pertencem a uma classe de proteínas designada de securinas; ambas as possuem uma sequência *consensus* de destruição que é reconhecida pelo APC. Quando se expressam formas não degradáveis de Pds1 e de Cut2 não se observa a separação dos cromatídeos irmãos (Cohen-Fix et al., 1996; Funabiki *et al.*, 1996). Esta observação sugeriu que as securinas são os inibidores do início da anafase.

As securinas interagem com uma classe diferente de proteínas: as separases (Cut1 em *S. pombe* e Esp1 em *S. cerevisiae*). Desta forma, a securina Pds1 interage com a separase Esp1, verificando-se o mesmo para a securina e separase de *S. pombe* (Cut1 e Pds1) (revisto em Hirano, 2000). As separases são muito importantes para a separação dos cromatídeos irmãos, visto que a interação das securinas (Pds1 e Cut2) com as separases (Esp1 e Cut1) impede esta separação antes do tempo (revisto em Hirano, 2000).

Após a degradação da Pds1, a Esp1 é libertada e vai clivar a coesina Scc1 (Uhlmann *et al.*, 1999). A proteína Scc1 assegura a coesão dos cromatídeos irmãos desde a fase S até à transição metafase-anafase (Michaelis *et al.*, 1997). Assim, após a clivagem da Scc1 os cromatídeos irmão separam-se e dá-se início a anafase.

Com base na homologia com proteínas de levedura, identificou-se a securina em organismos vertebrados (*Xenopus*, ratinho e humano) (Zou *et al.*, 1999). E uma vez mais há uma conservação neste mecanismo biológico entre organismos, pois a securina liga-se ao homólogo da separina nestes mesmos organismos (Zou *et al.*, 1999). A securina de organismos vertebrados é regulada pelo ciclo celular, sendo, como os seus homólogos em levedura, degradada pelo APC através do reconhecimento da sequência *consensus* de destruição (Zou *et al.*, 1999).

Mas, como é que o APC reconhece os seus substratos? E, porque é que a degradação dos alvos do APC ocorre de uma forma temporalmente ordenada?

1.4.4 A regulação do APC

Uma maquinaria de degradação celular, como o APC, tem que ser regulada pela célula de uma forma bastante sofisticada. À medida que se identificaram substratos do APC, ficou evidente que a degradação de alguns destes se inicia na transição metafase-anafase (como por exemplo a Pds1), enquanto que a proteólise de outros substratos, como por exemplo da ciclina B, se inicia somente em anafase (revisto em Page & Hieter, 1999). E de facto, a incapacidade do APC de degradar os substratos iniciais induz uma paragem em

metáfase, enquanto que a incapacidade de degradar os substratos tardios induz paragem em anáfase.

O APC parece ser regulado temporalmente de duas formas distintas: por fosforilação ou por associação a diferentes proteínas (Cdc20 e Cdh1).

A fosforilação das subunidades do APC podem ser tanto activadora como inibidora. É possível que o APC seja activado por cinases e fosfatases no início de anáfase e, provavelmente a sua fosforilação por uma determinada cinase irá apenas afectar a actividade do APC relativamente substratos específicos (revisto em Page & Hieter, 1999).

Por outro lado, as proteínas Cdc20 de *S. cerevisiae* (FIZZY de *Drosophila melanogaster*) e Cdh1 de *S.cerevisiae* (FIZZY RELATED de *Drosophila melanogaster*) são necessárias para que o APC reconheça os seus substratos permitindo, a destruição temporal ordenada destes (revisto em Page & Hieter, 1999). Assim, os complexos APC^{CDC20} e APC7C^{Cdh1} têm substratos alvo diferentes (Visintin *et al.*, 1997). No início da mitose o APC liga-se à Cdc20 e promove a ubiquitinação de proteínas que tenham um motivo RXXLXXXXN (o sinal de destruição) (Glutzer *et al.*, 1991), sequência que existe na ciclina B e nas securinas.

No entanto, em anáfase a Cdh1 liga-se ao APC, substituindo a Cdc20. Esta ligação vai alterar a especificidade de substratos do APC. Agora, o complexo APC^{Cdh1} reconhece as proteínas que tenham a sequência de destruição que já referimos acima (RXXLXXXXN) e uma outra sequência designada de KEN box, na qual são reconhecidos os aminoácidos K, E, e N (Pleger & Kirschner, 2000). A transição de APC^{Cdc20} para APC^{Cdh1} é despoletada por desfosforilação da Cdh1 pela fosfatase Cdc14. Esta desfosforilação origina a substituição de Cdc20 por Cdh1 no APC, e a proteína Cdc20 agora livre é um substrato do APC^{Cdh1}; desta forma a célula assegura a irreversibilidade desta transição (Pleger & Kirschner, 2000). Neste momento dá-se início da saída de mitose, pois as ciclinas mitóticas são degradadas. Após este passo a célula pode então prosseguir para a separação física entre as duas células filhas (a citocinese).

1.5 A citocinese

A citocinese é o evento final da divisão celular, através do qual a célula mãe corta em duas células filhas. De forma a assegurar que a progenia celular tenha toda o mesmo conteúdo genómico é essencial para a célula que a citocinese só ocorra após a mitose. Se se analisar em detalhe a execução dos processos citocinéticos, verifica-se que esta é variável em diferentes organismos. No entanto, os eventos principais do processo encontram-se conservados.

Devido à complexidade deste mecanismo e ao vasto conhecimento existente sobre as inúmeras proteínas envolvidas no processo citocinético, a sua descrição torna-se difícil e complexa. De forma a simplificar esta descrição decidiu-se começar por se descrever como é que diferentes organismos escolhem o seu local de divisão (este é um dos aspectos menos conservados da citocinese). Seguidamente explica-se a formação do anel de actomiosina, onde são descritas as proteínas necessárias para a sua formação e ainda a ordem de montagem destas. Em células animais, durante a mitose e, em simultâneo com a montagem dos componentes do anel contráctil, dá-se a formação do sulco de clivagem. O posicionamento do sulco de clivagem é definido pela posição do fuso mitótico. No final da descrição do mecanismo citocinético pretende-se ainda, de uma forma breve, estabelecer a relação existente entre a zona mediana do fuso (de células animais) e o anel contráctil, analisando de que forma é que esta dependência contribui para o processo citocinético.

Muito resumidamente, e antes de se iniciarem as descrições mais detalhadas sobre o mecanismo citocinético, indica-se a ordem de eventos deste processo celular em células animais, e nas leveduras *S. pombe* e *S. cerevisiae* (Figura -1-2):

- A *S. cerevisiae* divide-se por gemulação. Neste organismo, e ao contrário do que se observa em células animais e em *S. pombe*, o local de gemulação é definido antes de se iniciar a divisão. A gémula cresce para fora do córtex da célula mãe e o anel contráctil forma-se no pescoço da gémula. Assim como em *S. pombe*, em *S. cerevisiae* forma-se ainda um septo que é sintetizado atrás do anel de constrição e que, para que haja a separação física das duas células filhas, também tem que ser degradado por enzimas digestivas.
- Em *S. pombe*, o anel de actomiosina também é posicionado no equador da célula. Estas células sintetizam também um septo, e à medida que o anel da actomiosina contrai, o septo promove a formação de parede celular entre as duas células filhas. No final do processo o septo é degradado por enzimas digestivas, separando desta forma as duas células filhas.
- Nas células animais, o primeiro evento é a definição do local de clivagem, geralmente no equador da célula. Subsequentemente, dá-se a montagem do sulco de clivagem no local da divisão. O sulco de clivagem contém actina, miosina e outras proteínas que são organizadas num anel contráctil, ao anel contráctil chama-se anel de actomiosina. O anel contrai e cria uma barreira física entre os citoplasmas da cada célula filha. A contracção do anel faz com que os componentes da zona mediana do fuso se foquem numa estrutura que se chama midbody. No evento final da citocinese, a clivagem, dá-se a separação das duas células filhas.

É notório que em todos estes organismos a citocinese se dê através da formação e constrição de um anel de actomiosina (para revisão ver Guertin *et al.*, 2002), o que indica a conservação do mecanismo base da citocinese. No entanto, desta breve descrição inicial percebe-se imediatamente que a escolha do local de divisão é um processo bastante variável.

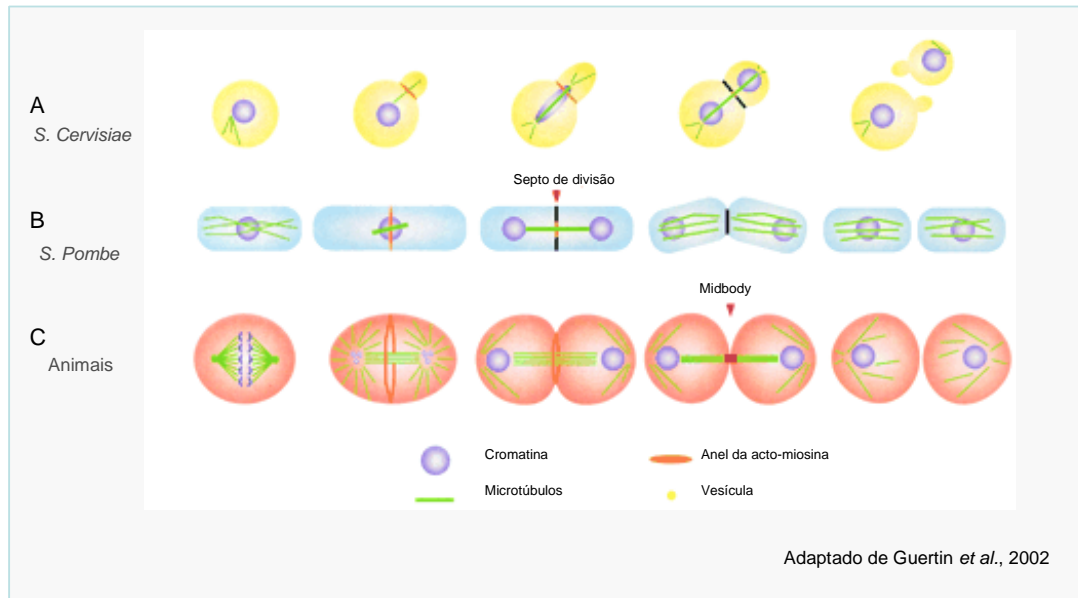


Figura 1.2 – Mecanismos gerais da citocinese em eucariotas. Apresenta-se um esquema da citocinese, nas leveduras *S. cerevisiae* e *S. pombe*, e em animais. (adaptado de Guertin *et al.*, 2002)

1.5.1 A definição do local de divisão

Os mecanismos que promovem a selecção do local de divisão são um dos aspectos menos conservados do processo citocinético, existindo grandes divergências entre os diferentes organismos.

No caso da levedura *S.cerevisiae* o local de divisão é determinado pelo local da divisão anterior. Em G1 a cascata de sinalização promove a formação de um anel de proteínas, as septinas, e este anel forma-se adjacente ao local anterior de gemulação (revisto em Longtine *et al.*, 1996), onde o anel de septinas vai dirigir a formação da nova gémula. A gémula cresce para fora do córtex da célula mãe, e o local onde se iniciou a formação da gémula será futuro local de citocinese (revisto em Longtine *et al.*, 1996). As septinas estão também envolvidas no recrutamento de proteínas envolvidas na formação do anel de actomiosina.

Na levedura *S.pombe* o local de divisão é definido pelo posicionamento do núcleo, que se mantém no centro da célula por acção de um mecanismo dependente dos microtúbulos (Tran *et al.*, 2001). A indicação de que é o núcleo que define o posicionamento do local de clivagem neste organismo surgiu da observação que, em leveduras mutantes em genes cujo o fenótipo deu origem a um posicionamento erróneo do núcleo, a divisão dava-se no local onde o núcleo se encontrava e não no centro da célula (revisto em Guertin *et al.*, 2002). Compreendeu-se mais tarde que a proteína Mid1 tem um papel determinante nessa definição do local de clivagem (Paoletti & Chang, 2000). A Mid1 oscila (durante a interfase e no início da mitose) entre o núcleo e a região cortical mediana do citoplasma, formando uma banda perpendicular ao núcleo (Paoletti & Chang, 2000). Seguidamente, durante a mitose, a Mid1 é fosforilada e sai do núcleo (esta libertação é dependente da cinase Plo1) (Bahler *et al.*, 1998). Após a sua libertação, a Mid1 localiza-se no córtex da célula e forma uma banda que se sobrepõe ao núcleo, dá-se o recrutamento de proteínas que formam o anel da actomiosina para essa banda, especificando-se desta forma o local de clivagem (Bahler *et al.*, 1998).

Nas células animais, é o fuso mitótico que define a posição do sulco de clivagem. No entanto, o mecanismo de definição desta posição permanece ainda controverso. Existem actualmente três modelos para explicar o posicionamento do sulco de clivagem: o modelo de relaxamento astral (proposto por White e Borisy), o modelo da estimulação equatorial (proposto por Rappaport) e o modelo em que a estimulação equatorial se obtém através de sinais que emergem da zona mediana do fuso (figura 1.3) (revisto em Oegema & Mitchison, 1997). Em todos os modelos, o fuso mitótico é, como já se referiu, determinante para o posicionamento do sulco de clivagem. No entanto, o papel dos microtúbulos na definição desse posicionamento é controverso .

- No modelo da relaxação astral propõe-se que os microtúbulos astrais do aparelho mitótico induzam uma relaxação do córtex. Este modelo assume que os sinais dos asters são máximos nos polos e mínimos no equador, e devido a isso há uma relaxação do córtex que produz uma diferença de tensão entre os polos e o equador, que resultando na contracção deste.
- No modelo da estimulação equatorial, que foi originalmente proposto por Rappaport, propõe-se (contrariamente ao modelo da relaxação astral) que a posição do sulco de clivagem é induzida por sinais emitidos pelos microtúbulos astrais (estes sinais que induzem a contracção). Neste modelo, prevê-se que os sinais emitidos pelos microtúbulos astrais sejam máximos no equador da célula, local onde o anel contráctil se vai formar.
- No terceiro modelo, propõe-se que a posição do sulco de clivagem é determinada por sinais que provêm da região mediana do fuso, modelo da

estimulação equatorial através de sinais que provêm da região mediana do fuso.

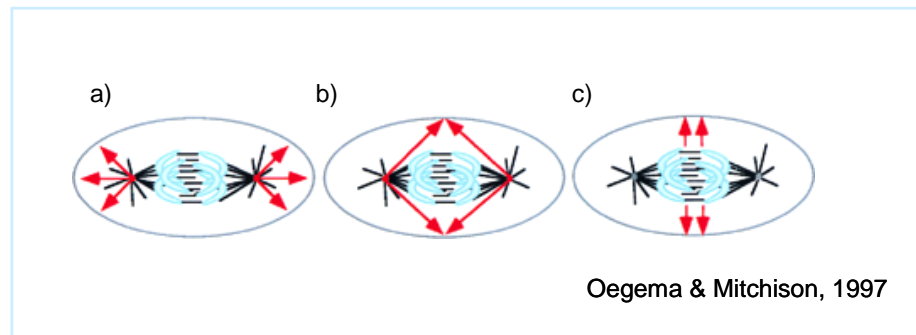


Figura 1.3 – Modelos que explicam como aparelho mitótico define a posição do sulco de clivagem em células animais. **a)** Modelo da relaxação astral. **b)** Modelo da estimulação equatorial através de sinais dos centros astrais que induzem a contração do córtex equatorial. **c)** Modelo da estimulação equatorial induzida por sinais que provêm da região mediana do fuso.

Não existe ainda uma resposta definitiva quanto ao modelo que melhor explica a definição do plano de clivagem em células animais. O facto destes três modelos surgirem da interpretação de resultados obtidos através de experiências realizadas em diferentes modelos animais, explica, em parte, a sua possível coexistência na natureza. No entanto, a observação de que uma pequena barreira colocada entre a zona mediana do fuso e o córtex da célula é capaz de inibir a formação do sulco de clivagem em células de bivalves, parece ser inconsistente com o modelo de relaxação astral. Este resultado também não seria necessariamente previsível pelo modelo da estimulação astral, mas é no entanto bastante consistente com o modelo no qual os sinais provêm da região mediana do fuso (revisto em Oegema & Mitchison, 1997). No entanto, o modelo da estimulação astral explica, de uma forma consistente, os resultados obtidos em células de grande dimensão, como por exemplo os ovos de organismos marinhos invertebrados (revisto em Wang *et al.*, 2003). Por outro lado, o modelo da estimulação do córtex, induzida por sinais que provêm da região mediana do fuso, explica o posicionamento do fuso numa grande variedade de células somáticas de diferentes organismos, como por exemplo da *Drosophila* e humanos (revisto em Wang *et al.*, 2003), sendo este possivelmente o mecanismo mais generalizado nas células somáticas de organismos vertebrados.

1.5.2 A formação do anel de actomiosina

Após a definição do local de divisão, as células têm que recrutar para a zona de clivagem os componentes que irão promover a citocinese. Estes irão constituir um anel contráctil, o anel de actomiosina. Em leveduras e em células animais, é a formação e constrição de um anel contráctil de actomiosina que promove a separação física entre as

duas células filhas. O anel forma-se no córtex da célula, observando-se a sua constrição no final de anáfase / início de telófase. A actina e a miosina são, como o nome indica, componentes essenciais do anel de actomiosina, mas não são no entanto as únicas; existem muitas outras proteínas necessárias à sua formação.

1.5.2.1 As proteínas Miosina tipo II

Pensa-se que a miosina tipo II é o motor que produz a força necessária para a contracção do anel de actomiosina. Esta proteína é um dímero constituído por duas cadeias pesadas, tendo cada delas associada duas proteínas: a cadeia leve essencial de miosina (ELC, do inglês Essential miosin Light Chain) e a cadeia regulatória (RCL, do inglês Regulatory Light Chain). A análise da cadeia pesada da miosina revela os seguintes domínios: com actividade motora, de ligação à actina, e de dimerização. Não é difícil pensar que estes domínios sejam importantes para que a miosina possa promover a formação e contracção do anel de actomiosina.

A miosina é uma proteína que existe nos músculos, onde forma filamentos bipolares longos que se entrecruzam com os filamentos da actina, e os puxam, dando origem à contracção muscular. Actualmente pensa-se que o anel de actomiosina funciona de uma forma semelhante a um músculo; assim conjuntos de filamentos bipolares de miosina que se encontram ligados uns aos outros pela acção dos filamentos de actina, impulsionam a constrição do anel e consequentemente a citocinese. No entanto, e apesar de este modelo ser bastante atractivo, não se provou ainda a sua veracidade.

Mas, a miosina é indubitavelmente uma proteína importante para a citocinese. Por exemplo, em células animais e de fungos, a miosina é essencial para o correcto funcionamento do anel de actomiosina, dado que em diversos organismos a perda de função da miosina provoca defeitos de citocinese (*Dyctyostelium discoideum*, *Drosophila melanogaster*, *S. cerevisiae* e *S. pombe*) (revisto em Guertin *et al.*, 2002).

1.5.2.2 As Septinas

As septinas foram inicialmente descritas em *S. cerevisiae*, verificando-se que são uma família de proteínas necessária para a citocinese e para a morfologia celular neste organismo (revisto em Guertin *et al.*, 2002). Observou-se que, na levedura de gemulação, as septinas funcionam como um suporte estrutural para a montagem de outros componentes do anel da actomiosina, as chitinas (DeMartini *et al.*, 1997).

As septinas existem também em organismos eucariotas superiores, tendo já sido identificadas em *Drosophila* e em ratinho. A septina de *Drosophila*, PEANUT, localiza-se no sulco de clivagem e moscas mutantes em *peanut* têm defeitos de citocinese (Neufeld & Rubin, 1994). Também como em leveduras e em *Drosophila*, em células de ratinho, a perda

de função da septina de Ned5 (por micro-injecção de anticorpos) causa bloqueio na citocinese e formação de células binucleadas (Kinoshita *et al.*, 1997).

1.5.2.3 As proteínas tipo Cdc15

O gene *Cdc15*⁶ foi inicialmente descrito em *S.pombe*, onde se observou que células mutantes neste gene não formam um septo, mas entram em divisão nuclear contínua, originando células multinucleadas (Fankhauser *et al.*, 1995). Consistente com uma função citocinética, a proteína Cdc15 (assim como a proteína Imp2 uma proteína da família de Cdc15), tem uma localização no anel contráctil de actomiosina.

No caso da *S. cerevisiae*, já se descreveu uma proteína tipo Cdc15, a Cyk2/Hof1 (Kamet *et al.*, 1998; Lippincott & Li, 1998). Esta proteína (Cyk2/Hof1) forma um anel duplo que coincide com o anel de septinas durante a maioria do ciclo celular (Lippincott & Li, 1998). No entanto, em citocinese o anel duplo de Cyk2/Hof1 coincide com o anel de actomiosina. A função citocinética da Cyk2/Hof1, foi revelada por análise de mutantes no gene que codifica para esta proteína. Estes, apesar de formarem um anel contráctil de actomiosina, não conseguem levar a cabo a sua constrição (Lippincott & Li, 1998). Para além disso, a sobreexpressão de Cyk2/Hof1 causa também defeitos de citocinese, provavelmente devidos à incorrecta localização das septinas (Lippincott & Li, 1998).

Consistente com uma conservação das bases do mecanismo citocinético, proteínas da família das proteínas tipo Cdc15 foram também descritas em mamíferos, são elas a PSTPIP1 (Spencet *et al.*, 1997) e a PSTPIP2 (Wu *et al.*, 1998). Apesar da função destas proteínas ainda não estar definida, duas observações apontam para que estas sejam também necessárias para a citocinese: ambas se localizam no sulco de clivagem, e ainda, a sobreexpressão de PSTPIP1 em *S. pombe* tem um efeito dominante negativo sobre Cdc15 e provoca defeitos de citocinese (Spencet *et al.*, 1997).

1.5.2.4 As proteínas tipo IQGAP

Uma outra família de proteínas envolvida na formação do anel de actomiosina é a família das proteínas tipo IQGAP. Estas proteínas são caracterizadas por possuírem vários domínios funcionais: um domínio de ligação à actina que se designa por domínio calponina (CH), domínios IQ, domínios WW e um domínio de activação de GTPase⁷ (revisto em Guertin *et al.*, 2002).

Em *S.pombe*, a Rn2g (IQGAP deste organismo) está directamente implicada na formação do anel de actomiosina, pois leveduras mutantes neste gene são incapazes de

⁶ Não confundir com o *CDC15* de *S. cerevisiae*.

⁷ **domínios CH** - Domínio de ligação à actina; **domínios WW**- Domínio de ligação à sequência do tipo PPYP ou PPXY (P-prolina, L-lisina, X- qualquer aminaácido). **domínios IQ** – Domínios de ligação à calmodulina e à cadeia leve da miosina. Estes encontram-se em muitas proteínas do citoesqueleto.

formar este anel (Eng *et al.*, 1998). Também na levedura *S.cerevisiae*, os mutantes em *CYK1/IQG1* (a IQGAP de *S. cerevisiae*) são incapazes de recrutar a actina para a formação do anel de actomiosina, o que origina falhas de citocinese (Lippincott & Li, 1998b). Assim, as proteínas tipo IQGAP de ambas as leveduras são necessárias para a citocinese, estando envolvidas na formação do anel de actomiosina. Um resultado muito interessante, que pode estabelecer a ligação entre a saída de mitose e o início da citocinese, é ter-se demonstrado que a *Cyk1/Iqg1* se liga a *Tem1* (*in vitro*) (Shannon & Li, 1999). Como a *Tem1* pertence à cascata de sinalização que promove a saída de mitose em *S.cerevisiae* (MEN), esta interação poderá ser o elo de ligação entre os estes dois eventos celulares.

Em mamíferos, mais precisamente em células humanas, estão descritas duas proteínas tipo IQGAP: a IQGAP1 e a IQGAP2. No entanto, na base de dados do genoma humano estão depositadas sequências que codificam para três proteínas tipo IQGAP, o que sugere a existência de uma terceira proteína desta família) (revisto em Briggs & Sacks, 2003). A IQGAP1 é a proteína mais semelhante às proteínas das leveduras, *Rn2g* e *Cyk1/Iqg1*; tem a capacidade de se ligar à cadeia leve da miosina, *in vitro* promove a polimerização da actina e estabiliza a forma de *Cdc42* ligada ao GTP (revisto em Briggs & Sacks, 2003). No entanto, uma relação desta proteína com a citocinese em mamíferos ainda não foi descrita.

1.5.2.5 As GTPases de baixo peso molecular

As GTPases são proteínas caracterizadas por alternarem entre um estado activo (ligado ao GTP) e inactivo (ligado ao GDP); quando num estado activo, as GTPases são activadoras de cascatas de sinalização intracelulares. Entre as famílias de GTPases, as que já se verificou estarem envolvidas na citocinese em diferentes organismos, foram as proteínas tipo Rho, Rac e *Cdc42*.

Em células animais, a inactivação de GTPases tipo Rho impede a montagem dos filamentos de actina e promove a desmontagem do anel contráctil, resultando na inibição da citocinese (para revisões ver Geurtin *et al.*, 2002 e Prokopenko *et al.*, 2000).

Seguindo a cascata de sinalização, entre os alvos de Rho que se demonstraram serem necessários para a citocinese, estão as proteínas *Diaphanous* (de *Drosophila*), e o seu homólogo *p140mDia* (de rato). Ambas as proteínas se ligam e regulam a profilina (uma proteína necessária para a polimerização da actina). Uma outra proteína alvo de Rho é a cinase associada a Rho, *Rock* (de Rho Kinase); esta promove a citocinese fosforilando a cadeia leve da miosina no sulco de clivagem. Uma prova adicional da sua função na citocinese é o facto da inibição de *Rock* provocar um atraso na ingressão do sulco de clivagem (Kosako *et al.*, 2000). A cinase *citron* é outra cinase que se pensa ser alvo de Rho. Localiza-se no midbody e no sulco de clivagem de células HeLa (Malaude *et al.*, 1998). A cinase *citron* fosforila a cadeia leve da miosina (Yamashiro *et al.*, 2003), e a sua

sobreexpressão induz a formação de uma constrição anormal do anel de actomiosina, enquanto que a sobreexpressão da cinase morta induz multinucleação (Malaude *et al.*, 1998). Estes resultados sugerem que esta cinase necessita de estar activa para a correcta execução da citocinese.

Assim, a GTPase Rho é uma proteína fundamental para o controlo da citocinese em células de mamíferos, cujos alvos estão directamente implicados na construção do anel de actomiosina.

1.5.2.6 As forminas

As forminas são uma família numerosa de proteínas caracterizada por terem domínios FH (FH1, FH2 e FH3 – domínios de homologia de forminas). Entre as forminas encontram-se as proteínas diaphanous (*Drosophila*), Bin1 (*S. cerevisiae*) e Cdc12 (*S. pombe*); esta família de proteínas encontra-se envolvida em vários processos celulares, sendo um deles a citocinese. A interacção das forminas com diversas proteínas do anel de actomiosina, como por exemplo as GTPases Rho e Cdc42, a profilina, a actina e a Cyk2/Hof1, é uma indicação da sua função citocinética. Pelo facto das forminas interagirem com diferentes componentes do anel de actomiosina, propôs-se que estas eram proteínas estruturais cuja função de suporte era para outras proteínas. No entanto, observou-se recentemente que as forminas Bin1 e Cdc12 têm uma função directa na dinâmica da actina, visto que a sobreexpressão dos seus domínios FH1 e FH2 induz a formação de cabos de actina. Além disso, ensaios *in vitro* demonstraram que Cdc12 e Bin1 promovem a nucleação da actina, aumentando desta forma a sua velocidade de polimerização (revisto em Wallar & Albetts, 2003; Guertin *et al.*, 2002). Assim, as forminas para além de uma possível função estrutural de suporte para os componentes do anel de actomiosina, estão (provavelmente) também implicadas na polimerização da actina no anel contráctil.

A função citocinética das forminas encontra-se também conservada nas células animais, onde a microinjecção de anticorpos anti-mDia1 interfere com a citocinese, induzindo a formação de células binucleadas (Tominaga *et al.*, 2000).

Da descrição apresentada percebe-se que existem várias famílias de proteínas envolvidas na formação do anel de actomiosina: as proteínas da miosina tipo II, as septinas, as proteínas tipo Cdc15, as proteínas tipo IQGAP, as GTPases de baixo peso molecular e alguns dos seus alvos e as forminas. No entanto, para que se dê a formação de um anel de actomiosina funcional, os componentes deste anel têm que ser recrutados de uma forma ordenada.

1.5.2.7 A ordem de *montagem* dos componentes do anel de actomiosina

A determinação da sequência de recrutamento dos componentes do anel de actomiosina foi bastante difícil. O que se sabe sobre a ordem de recrutamento destes componentes é resultante principalmente de estudos obtidos em *S.cerevisiae*, uma vez que a definição do local de clivagem se dá no início do ciclo celular a análise do recrutamento dos componentes do anel de actomiosina é facilitada neste organismo. No entanto, muito recentemente obtiveram-se dados que também apresentam uma possível ordem de recrutamento dos componentes do anel contráctil para *S. pombe*.

Em *S. cerevisiae* a *montagem* da miosina no anel contráctil depende das septinas, e o anel de miosina é estável mesmo na presença de actina despolimerizada (Bi *et al.*, 1998). A proteína Mlc1 (Mysin Light Chain 1 - que é uma cadeia leve da miosina tipo 5 em *S. cerevisiae*) interage com as septinas, e a sua localização no anel contráctil é dependente destas proteínas (Boyne *et al.*, 2000). Seguidamente, a localização de Mlc1 no pescoço da gémula é essencial para recrutar a IQGAP - Cyk1/lqg1 para o anel (Boyne *et al.*, 2000; Shannon and Li, 2000). Esta IQGAP é importante para o recrutamento da actina para o pescoço da gémula durante a anáfase (Lippincott, & Li, 1998) (na sua ausência não se observa a contracção do anel de actomiosina e as leveduras não completam a citocinese).

Um outro dado interessante é, como já se referiu, a interacção entre a Cyk1/lqg1 e a proteína Tem1 (Shannon & Li, 1999), pois este poderá ser a ligação entre a cascata de sinalização que promove a saída de mitose (MEN) e a formação do anel contráctil neste organismo.

Em *S. pombe*, a formação do anel de actomiosina e a subsequente citocinese envolve quatro passos distintos, nos quais se vão formando progressivamente estruturas mais complexas. Na primeira fase, forma-se uma banda larga de proteínas que irão formar o anel da actomiosina. A proteína Plo1 promove a saída da Mid1 do núcleo, e esta concentra-se adjacente ao córtex da célula (Bahler *et al.*, 1998). Na transição G2/M, a esta banda larga de Mid1 juntam-se a miosina tipo II (Myo2, Cdc4 e Rcl1) e a IQGAP-Rn2p; seguidamente acumulam-se as proteínas Cdc15 e a formina Cdc12, sendo a acumulação destas proteínas no equador da célula dependente da Mid1 (Wu *et al.*, 2003). Na segunda fase (durante a anáfase A) a actina e a tropomiosina Cdc8 juntam-se a esta banda larga, e a banda coalesce num anel compacto (Wu *et al.*, 2003). Na terceira fase (durante a anáfase B) o anel contráctil matura pela associação da miosina tipo II (Myop2p) e das septinas; não se sabe a que proteína(s) se ligam as septinas, pensa-se no entanto que a Myop2p se ligará provavelmente à actina (Wu *et al.*, 2003). Na quarta e última fase, após a

dissolução do fuso mitótico, o anel contráctil constrange e desmonta-se.

Estes mecanismos dependem da cascata de sinalização que controla a septação (SIN): não se sabe no entanto qual a ligação entre essa casca de sinalização e as proteínas do anel contráctil.

1.5.3 A formação do sulco de clivagem em células animais

Em células animais, o posicionamento e a montagem do anel de actomiosina ocorrem simultaneamente. As duas famílias de proteínas que se sabe serem importantes para a formação do sulco de clivagem e para a citocinese são as proteínas passageiras dos cromossomas e as proteínas motoras. As proteínas passageiras dos cromossomas, são caracterizadas por apresentarem uma localização bastante dinâmica durante a mitose, sendo detectadas inicialmente nos cromossomas e nos centrossomas e, no final da divisão no sulco de clivagem. As proteínas motoras são necessárias para a manutenção da zona mediana do fuso.

1.5.3.1 As proteínas passageiras dos cromossomas

As proteínas INCENP, AuroraB/Ipl1, Bir1/Survivin e TD-60 são todas pertencentes ao grupo das proteínas passageiras dos cromossomas (revisto em Guertin *et al.*, 2002).

A proteína TD-60 foi inicialmente identificada através de um soro auto-imune que continha anticorpos contra uma proteína de 60 kDa. Esta proteína localiza-se no região interna dos centrómeros no início da mitose e, move-se para a região mediana do fuso em anafase. A sua localização em anafase tardia designou-se de disco de telofase (TD); este disco está presente em telofase na região mediana do fuso, e pensa-se ser importante para a citocinese (revisto em Burke & Stukenberg, 2003). O gene que codifica para a proteína TD-60 foi recentemente clonado, verificando-se que TD-60 codifica para uma GEF (Mollinari *et al.*, 2003). A depleção dos níveis de TD-60 por RNAi causa paragem em prometáfase, e impede a localização de outras proteínas deste grupo: a Aurora B e a Survivin (Mollinari *et al.*, 2003). Os efeitos directos da TD-60 na citocinese não foram ainda determinados, devido ao bloqueio em prometáfase que se observa após a depleção desta proteína por RNAi. No entanto, o facto da localização de Aurora B ser dependente de TD-60 sugere pelo menos, uma relação indirecta de TD-60 na promoção da citocinese.

A INCENP, inicialmente caracterizada pelo grupo do Dr Earnshaw foi a primeira das proteínas passageiras a ser descrita (Cooke *et al.*, 1987). A INCENP localiza-se nos centrómeros em metafase, no sulco de clivagem em anafase e no midbody em telofase (Cooke *et al.*, 1987). A expressão de formas dominantes negativas da INCENP e da depleção dos níveis endógenos da proteína (por RNAi), resultaram na observação de

defeitos de citocinese (Eckley *et al.*, 1997; Mackay *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 2001).

A cinase Aurora B⁸ faz parte de uma família de proteínas cinases do tipo serina/treonina, envolvidas na regulação da segregação cromossómica e da citocinese. (revisto em Guertin *et al.*, 2002). A Aurora B humana auto-fosforila-se, sendo a auto-fosforilação essencial para a citocinese (Yasui *et al.*, 2004). Estão descritos como alvos desta cinase no midbody a vimentina e a MgRacGap (Goto *et al.*, 2003; Minoshima *et al.*, 2003). A Aurora B regula a fosforilação da vimentina no sulco de clivagem, controlando a segregação dos filamentos de vimentina na citocinese (Goto *et al.*, 2003). A fosforilação da MgRacGap converte esta proteína numa RhoGap no midbody (Minoshima *et al.*, 2003). Após a fosforilação pela Aurora B, a RhoGap vai então exercer a sua actividade de GAP sobre a RhoA (Minoshima *et al.*, 2003). Esta fosforilação de MgRacGap é crítica para a finalização da citocinese (Minoshima *et al.*, 2003). Assim, a cinase aurora A está directamente envolvida na finalização do processo citocinético.

A terceira família de proteínas passageiras dos cromossomas envolvidas na citocinese, é a das proteínas tipo survivin. A proteína survivin de *C. elegans* é necessária para a citocinese, e o defeito citocinético que se observa devido à sua ausência é revertido por complementação com a expressão do seu homólogo de mamíferos (revisto em Guertin *et al.*, 2002). Este resultado sugere que a função destas proteínas está conservada entre *C. elegans* e humanos. A observação que a depleção de survivin em células de mamífero causa uma incapacidade de recrutar Aurora B para os cromossomas, e ainda poliploidia (Lens *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2003) poderá ser uma indicação para a sua função citocinética. Para além destas informações, sabe-se também que a survivina interage com a Aurora B e que, nas células deplectadas em survivin, a Aurora B tem uma menor actividade cinásica (Chen *et al.*, 2003); este decréscimo da actividade cinásica da Aurora B, após a depleção de survivin é uma indicação do envolvimento, pelo menos indirecto, desta proteína na citocinese.

A função das proteínas passageiras dos cromossomas parece estar interligada. Como referido, a depleção de TD-60 deslocaliza a Aurora B, a INCENP e a survivin. Os resultados obtidos da análise das proteínas passageiras dos cromossomas sugerem que INCENP, survivin e Aurora B actuam conjuntamente na célula.

Observou-se ainda que a depleção Aurora B de células de *Drosophila* causa a deslocalização da proteína motora pavaroti/MKLP. Como a proteína pavaroti/MKLP é necessária para a formação da zona mediana do fuso, este resultado sugere que as

⁸ As proteínas do tipo Aurora B são designadas em *C. elegans* por AIR-2, em *Drosophila* por Aurora B, e em humanos por AIM-1.

proteínas passageiras dos cromossomas estão implicadas na formação da zona mediana do fuso (revisto em Guertin *et al.*, 2002).

1.5.3.2 As proteínas motoras

As proteínas motoras que estão associadas com a região mediana do fuso são proteínas motoras do tipo cinesinas, da família das proteínas CHO1/MLKP e Klp3A. Ambas se localizam no fuso durante a metáfase e concentram-se na região mediana do fuso em anáfase (revisto em Guertin *et al.*, 2002).

Nos mutantes nos genes de *Drosophila pavaroti* (homólogo de CHO1/MLKP) e *Klp3A*, observa-se a ocorrência normal da anáfase; no entanto, a citocinese falha devido a uma incapacidade das células formarem correctamente a zona mediana do fuso e o anel contráctil, implicando estas proteínas na formação de ambas as estruturas (Adams *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 1995). Para além disso, as proteínas do sulco de clivagem PEANUT, ACTINA e ANILINA estão deslocalizadas nos mutantes *pavarotti* (Adams *et al.*, 1998). Quando a zona mediana do fuso não está correctamente formada, observa-se falha na formação do anel contráctil, o que sugere que em *Drosophila* a zona mediana do fuso é importante para a formação do anel contráctil.

Em embriões de *C. elegans*, após RNAi de Zen4 (homólogo de CHO1/MLKP), observa-se uma anáfase e início da constrição normais (Powers *et al.*, 1998). No entanto, os microtúbulos da zona mediana do fuso não estabilizam e não formam o midbody; consequentemente a contracção do sulco de clivagem reverte originando falhas de citocinese (Powers *et al.*, 1998). Assim, em *C. elegans*, a formação da zona mediana do fuso não é necessária para a formação do sulco de clivagem, mas sim para a finalização da citocinese.

Estas proteínas são também importantes em células de mamíferos para a citocinese. Observou-se a mutação do local de ligação ao ATP da proteína CHO1/MLKP, ou a deplecção dos níveis endógenos de proteína por RNAi induz um incapacidade das células de mamíferos completarem a citocinese (Matuliena & Kuriyama, 2002). Não se observou a formação do midbody, o que causa uma desorganização dos microtúbulos da zona mediana; este resultado levou à conclusão que CHO1/MLKP é (em células de mamífero) essencial para a correcta formação do zona mediana do fuso /midbody (Matuliena & Kuriyama, 2002).

Uma outra função para a CHO1 foi proposta por Kuriyama em 2002, após a observação de que a microinjecção de anticorpos específicos contra o exão 18 desta proteína também impede a citocinese. No entanto, neste caso, o sulco de clivagem e o midbody formam-se, e observa-se a contracção do anel de actomiosina, formando-se uma ponte intracelular entre as duas células, mas esta funde-se aproximadamente 3 horas após

a separação (Kuriyama *et al.*, 2002). Estes autores propõem então uma nova função para CHO1, que seria de estabelecer a relação entre o midbody e a membrana celular nos eventos finais necessários para a finalização da citocinese.

Apesar das divergências observadas, a conclusão que se retira destes estudos realizados em diferentes modelos animais, é que a proteína motora CHO1/MLKP é importante para a finalização da citocinese.

1.5.4 A finalização da citocinese

Para a divisão entre as duas células filhas estar completa, estas têm que ser capazes de “selar” (com membrana) o citoplasma que ainda as une. Para este processo se dar tem que existir uma interacção entre o anel contráctil e a membrana plasmática. Durante a citocinese vesículas membranares têm que ser transportadas para o sulco de clivagem. Quando localizadas no sulco de clivagem, estas fundem-se com a membrana existente de forma a aumentar a área da membrana citoplasmática, que irá permitir a separação das duas células filhas. (Para revisões ver Straight, & Field, 2000; Glotzer, 2003; Guertin *et al.*, 2002).

1.6 A coordenação da mitose com a citocinese

A coordenação da mitose com a citocinese é um problema que todas as células eucariotas têm que resolver, para que se dê uma transmissão estável dos seus genomas durante a divisão celular. Apesar de não se saber exactamente como é que essa coordenação é atingida, sabe-se que as cascatas de sinalização de *S.cerevisiae* MEN (Mitotic Exit Network) e de *S. pombe* SIN (Septation Initiation Network) contribuem para que estes organismos consigam essa coordenação. A MEN actua a dois níveis, sendo o primeiro a saída da mitose (por inactivação das ciclinas mitóticas) e o segundo a regulação da citocinese. A SIN permite a iniciação da contracção do anel contráctil da actina e a síntese do septo, impulsionando a citocinese. Ambas, SIN e MEN, são centradas numa GTPase que despoleta a sinalização através de cinases. (Para revisões ver Geymonat *et al.*, 2002; Simanis, 2003a; Simanis 2003b; Bardin & Amon, 2001; Jensen & Johnston, 2002)

1.6.1 A MEN (Mitotic Exit Network)

O evento essencial necessário para que as células saiam de mitose é a inactivação das CDKs mitóticas. Esta inactivação dá-se durante a anafase através da degradação das ciclinas mitóticas pelo APC^{Cdh1}. Em *S. cerevisiae*, a libertação da fosfatase Cdc14 do nucléolo em anafase tardia é o ultimo evento que vai permitir às células saírem de mitose e

prosseguirem para o próximo ciclo celular. A MEN (Mitotic Exit Network) é a cascata de sinalização que vai promover a libertação da Cdc14 do nucléolo.

A MEN é constituída por uma GTPase Tem1, pelo complexo Bub2-Bfa1/Byr4 (uma GAP), pela Lte1 (uma GEF), pelas cinases Cdc15, Dbf2 e Cdc5, pela fosfatase Cdc14, por uma proteína estrutural Nud1 e por uma proteína que se associa à cinase Dbf2, a Mob1. Os mutantes nos genes que codificam para proteínas pertencentes a MEN são caracterizados por apresentarem uma paragem em anafase tardia, com o fuso alongado e com elevados níveis das ciclinas mitóticas, o que resulta na sua incapacidade de sair de mitose.

No topo desta cascata de sinalização está a GTPase Tem1, que actua como um interruptor, que é activo quando está ligado ao GTP e inactivo quando ligado ao GDP. A Tem1 é regulada negativamente pela GAP Bub2/bfa1 (constituída por estas duas proteínas) e regulada positivamente pela GEF Lte1 (Bardin *et al.*, 2000). Imediatamente após a duplicação do SPB (em S/G2) e no início de anafase, a Tem1 localiza-se principalmente no SPB que vai migrar para a gémula (95/5); e, em anafase tardia Tem1 localiza-se nos dois SPBs (Pereira *et al.*, 2000). As proteínas Bub2 e Bfa1 têm uma localização semelhante a Tem1 mas, em anafase, tardia continua a observar-se a assimetria de localização nos dois SPBs (Pereira *et al.*, 2000), sendo a associação destas três proteínas no SPB dependente da proteína estrutural Nud1 (Gruneberg *et al.*, 2000). Esta assimetria é importante para a sua regulação.

Quando activa a Tem1 liga-se à Cdc15, promovendo a activação desta cinase. Subsequentemente a Cdc15 vai activar o complexo cinásico Dbf2/Mob1, fosforilando a Dbf2 nos resíduos Ser374 e Thr544. Esta fosforilação é dependente da associação da Dbf2 à Mob1 (Mah *et al.*, 2001). Pensa-se que a sinalização através da Cdc15 deve ser regulada pelo acesso aos seus substratos, pois a sua actividade cinásica é constante durante o ciclo celular (Asakawa *et al.*, 2001).

Por fim, e através de um mecanismo ainda não definido, o complexo Dbf2/Mob1 permite a libertação da Cdc14 do nucléolo. A fosfatase Cdc14, que é o elemento central desta cascata de sinalização, encontra-se durante G1, S, G2 e no início da mitose (metáfase) sequestrada (e inactiva) no nucléolo pela Cfi1/Nte1 (que é um componente do complexo RENT - do inglês Regulator of Nucleolar Silencing and Telophase) (Shou *et al.*, 1999; Visintin *et al.*, 1999).

Os alvos da Cdc14 para promover a saída de mitose são as proteínas Sic1, Swi5 e Cdh1/Hct1 (Visintin *et al.*, 1998). A actividade da Cdc14 permite a saída de mitose porque:

- A Sic1 é um inibidor das CDKs que é degradado durante o ciclo celular, e a desfosforilação de Sic1 por Cdc14 permite sua estabilização.
- A Swi5 é o factor de transcrição de Sic1, e a desfosforilação de Swi5 permite a sua translocação para o núcleo, o que favorece a transcrição de Sic1.

- A Cdh1/Hct1 é um componente do APC, e a desfosforilação de Cdh1/Hct1 promove a sua associação ao APC, despoletando a degradação das ciclinas mitóticas.

Para além de promover a saída de mitose, a Cdc14 também exerce uma regulação negativa sobre a MEN, desfosforilando a Bfa1 e reactivando assim o complexo Bub2/Bfa1. Uma vez reactivado, Bub2/Bfa1 converte Tem1^{GTP} em Tem1^{GDP} , induzindo a inactivação da cascata de sinalização (MEN) (Pereira *et al.*, 2002). Desta forma, a Cdc14 restringe a actividade de MEN a uma pequena janela de tempo em anafase, que é necessária e suficiente para promover a saída de mitose.

A cinase da família das proteínas polo, a Cdc5, é também um componente da cascata de sinalização MEN. No entanto, esta cinase actua em diferentes pontos da MEN, sendo por isso difícil definir exactamente a sua função nesta cascata de sinalização. No início de anafase, a Cdc5 fosforila a Bfa1, o que permite a inactivação da GAP Bfa1/Bub2 (Geymonat *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2001), e desta forma Tem1 pode iniciar a sinalização de MEN. A Cdc5 também fosforila o complexo Dbf2/Mob1, sendo necessária sua activação. (Lee *et al.*, 2001); e fosforila ainda a Net1/Cif1 facilitando a libertação da Cdc14 do nucléolo (Shou *et al.*, 2001) (figura 1.4).

Desta descrição percebe-se que a MEN é uma cascata de sinalização que deverá ter um mecanismo de regulação estrito de forma a impedir que se dê sua activação antes da segregação cromossómica.

1.6.2 A regulação de MEN

Um aspecto interessante da regulação de MEN é que esta se baseia na assimetria de localização de diferentes proteínas. Assim, como foi referido em cima, as proteínas Tem1, Bub2 e Bfa1 localizam-se preferencialmente no SPB que migra para a gémula (Pereira *et al.*, 2000). Para além disso, a GEF de Tem1 (a proteína Lte1) localiza-se no córtex da gémula, o que indica que a Let1 irá apenas interagir com a Tem1 quando o fuso mitótico entra na gémula (Bardin *et al.*, 2000). Estas observações culminaram na identificação de um novo ponto-de-controlo, o ponto-de-controlo de posicionamento do fuso; este tem como função garantir que o fuso mitótico alonga para dentro da célula filha antes que se dê a saída de mitose. Assim, durante a metafase e início de anafase, o complexo Bub2/Bfa1 mantém a GTPase Tem1 inactiva (ligada ao GDP). Quando a Tem1 é translocada para a gémula (esta proteína localiza-se no SPB que migra para a gémula), aproxima-se fisicamente da proteína de Lte1 (que está no córtex da gémula), o que resulta na alternância entre Tem1^{GDP} para Tem1^{GTP} , e consequentemente, na activação da Tem1. Uma vez activada, a Tem1 sinaliza a activação de MEN, permitindo a saída de mitose e a citocinese.

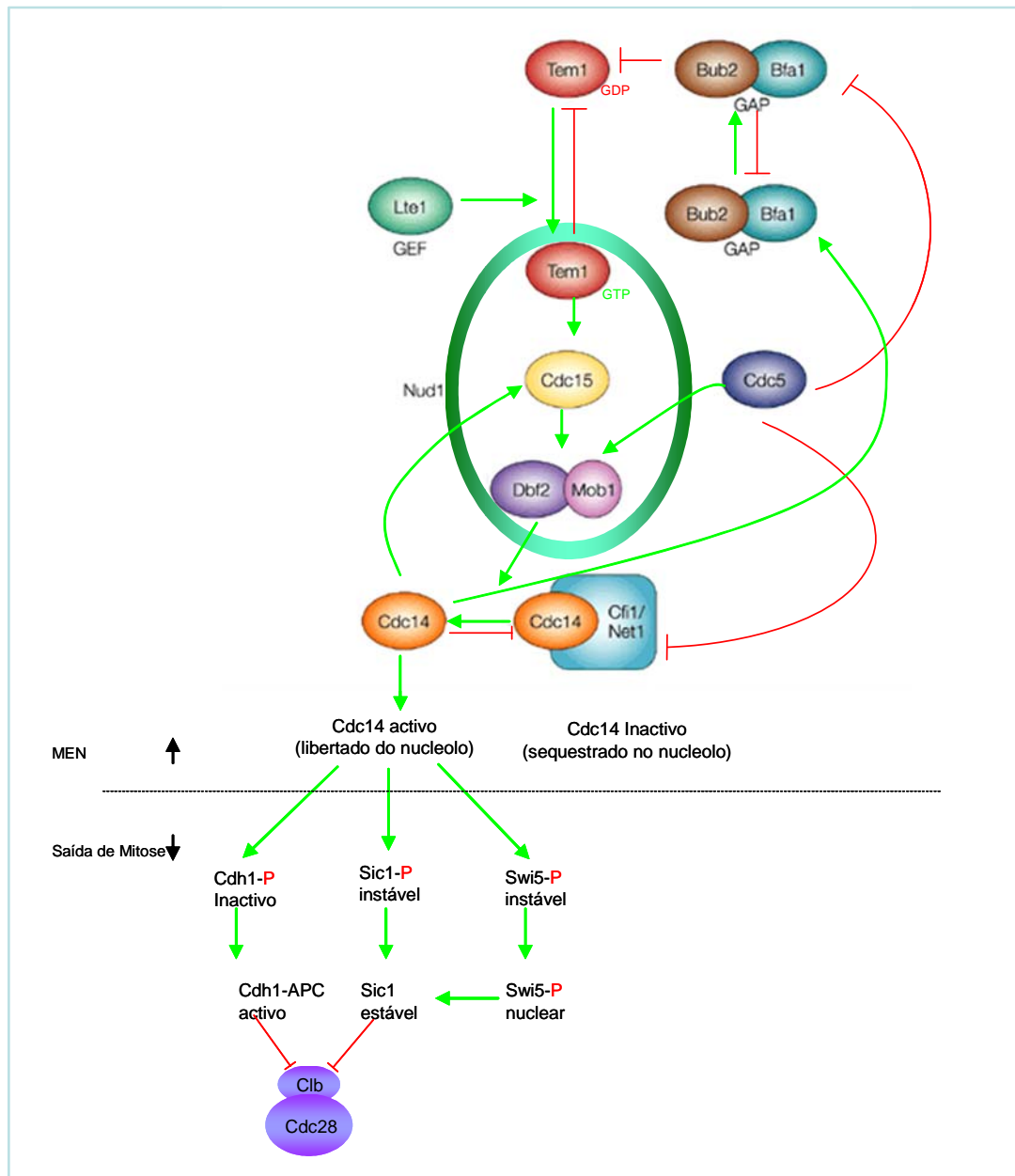


Figura 1.4 – Mecanismo da cascata de sinalização que promove a saída de Mitose em *S. cerevisiae*, MEN. As linhas verdes indicam eventos activadores, as linhas vermelhas indicam eventos inibidores. A linha a tracejado separa os componentes de MEN dos eventos que levam à saída de mitose após a libertação de Cdc14 do nucléolo. No topo de MEN está a GTPase Tem1, que está inactivada quando ligada ao GDP pela acção da GAP Bub2/Bfa1. Quando a SPB entra na gémula da célula filha, a GEF Let1 converte Tem^{GDP} em Tem^{GTP}. Este evento permite o recrutamento de Cdc15 para o SPB e a subsequente activação do complexo Dbf2/Mob1. A proteína Nud1 é um elemento estrutural que permite a ancoragem dos componentes acima referidos no SPB. Como resultado desta cascata de sinalização, a Cdc14 é libertada do nucléolo e vai desfosforilar Cdh1, Swi5 e Sic1. Este evento antagoniza a actividade das ciclinas mitóticas e promove a saída de mitose. A Cdc5 fosforila vários componentes de MEN, permitindo a actividade máxima desta cascata de sinalização. (Adaptado de Bardin & Amon, 2001).

A importância deste ponto-de-controlo é demonstrada na análise de mutantes de dineína, nos quais o fuso mitótico está frequentemente mal posicionado (Bardin *et al.*, 2000); de facto nas células em que o fuso mitótico se localiza apenas na célula mãe, a Tem1 não se pode aproximar da Lte1, e não é activada. Esta não activação da Tem1 induz um atraso na saída de mitose até que o fuso mitótico se posicione correctamente (entre a célula mãe e a gémula).

A proteína Bub2 parece pertencer a uma ramificação do ponto-de-controlo de montagem do fuso, onde, um dos ramos do ponto-de-controlo de montagem do fuso (no qual se incluem os genes *MAD1-3*, *BUB1* e *MPS1*) impede a separação prematura dos cromatídeos irmãos. O outro ramo do ponto-de-controlo (que contém os genes *BFA1* e *BUB2*) garante que a citocinese não se inicia antes da segregação dos cromossomas estar completa (Li, 1999). Nas células em que se utilizam agentes de despolimerização dos microtúbulos, observa-se a activação do mecanismo de ponto-de-controlo e, a consequente localização do complexo Bfa1/Bub2 nos dois SPBs, resultando na inibição da sinalização através de MEN, e desta forma na inibição da saída de mitose (Pereira *et al.*, 2001). Assim a regulação da activação de MEN obtém-se através de sinais exercidos sobre a proteína Tem1 que impedem a activação prematura da cascata de sinalização.

1.6.3 A cadeia de sinalização FEAR

Estudos recentes levaram à conclusão que a proteína Cdc14 (que é o alvo final da MEN) é também libertada do nucléolo durante um curto espaço de tempo no início de anafase. Estas observações resultaram na identificação de uma outra cadeia de sinalização, a FEAR. A FEAR de Cdc Fourteen Early Anafase Release, controla a libertação da Cdc14 no início de anafase (Stegmeier *et al.*, 2002). A descoberta da cadeia de sinalização FEAR levou à extensão do conhecimento sobre a saída de mitose em *S. cerevisiae*, concluindo-se que a decisão para as células saírem de mitose envolve não uma, mas duas cascatas de sinalização: a anteriormente descrita MEN, e a FEAR. Ambas controlam a libertação da Cdc14 do nucléolo, mas como referido a FEAR, controla a libertação da Cdc14 no início de anafase (Stegmeier *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2002), enquanto que a MEN controla a segunda libertação da Cdc14 do nucléolo (em anafase tardia).

A informação sobre esta cadeia de sinalização é ainda escassa, mas já se identificaram como proteínas envolvidas na FEAR a Esp1, a Cdc5, a Skl19 e a Spo12. No entanto, a possibilidade de existirem ainda outras proteínas envolvidas na libertação da Cdc14 do nucléolo no início de anafase não deve ser descartada.

Um dos competentes de FEAR é a separase Esp1, que está envolvida na transição metafase-anafase. Quando nesta fase do ciclo celular se dá a activação do ponto-de-controlo de degradação do DNA ou do ponto-de-controlo de montagem do fuso, a proteína Pds1 é estabilizada. Esta proteína é um inibidor da separase Esp1, o que resulta na

consequente inibição da FEAR e da MEN, nas células em que o ponto-de-controlo está activado. Assim, tendo em mente que a Pds1 é uma inibidora da Esp1, e que a Esp1 está envolvida na separação dos cromátídeos irmãos, uma hipótese para a função da FEAR será o estabelecimento do elo de ligação entre a separação dos cromátídeos irmãos e saída de mitose.

A FEAR está também envolvida na regulação positiva de MEN pois, após a libertação da Cdc14 (no início da anafase) esta vai localizar-se no SPB, onde se pensa que irá desfosforilar a Cdc15 (Jaspersen & Morgan, 2000); e, ao desfosforilar a Cdc15, a Cdc14 vai aumentar a actividade de MEN.

Um outro alvo da FEAR é o complexo INCENP/AuroraB (Sli5/Ilp1) (Pereira & Schiebel, 2003). A Cdc14 desfosforila a INCENP, e esta desfosforilação é necessária e suficiente para que o complexo Aurora B/INCENP se localize na zona mediana do fuso (Pereira & Schiebel, 2003). Sabe-se que o complexo AuroraB/INCENP promove a orientação bipolar dos cromossomas (Tanaka *et al.*, 2002), sendo a desfosforilação deste complexo pela Cdc14 importante para impedir a aneuploidia celular (Pereira & Schiebel, 2003).

Assim a FEAR actua possivelmente a três níveis na célula: estabelece a ligação entre a separação dos cromátídeos irmãos e a saída de mitose, assegura a correcta segregação dos cromátídeos irmãos e regula positivamente a actividade da MEN.

1.6.4 A coordenação entre a saída de mitose e a citocinese

A coordenação entre a saída de mitose e a citocinese parece ser dependente dos componentes da MEN. A observação de que, após a libertação de Cdc14 do nucléolo, vários componentes da MEN (Cdc5, Cdc15, Dbf2 e Mob1) se localizam no pescoço da gémula, forneceu as primeiras pistas de que os componentes da MEN estariam também envolvidos na citocinese (Song *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000; Yoshida & Toh-e, 2001). A análise das funções citocinéticas dos componentes de MEN passou pela utilização de mutantes nos quais as células conseguiam sair de mitose, mas tinham defeitos de citocinese. E, de facto, observou-se que em alguns mutantes de Mob1 (exp.: *mob1-83*) e de Cdc15 (exp.: *cdc15Δ135*) as células faziam vários ciclos de duplicação de DNA sem no entanto se observar citocinese, o que resulta na formação de cadeias de células interligadas (Luca *et al.*, 2001; Menssen *et al.*, 2001). A análise dos componentes do anel contráctil dessas cadeias de células, revelou a presença da actina nos mutantes de Cdc15 (Menssen *et al.*, 2001), e, nos mutantes Mob1 para além da actina, estavam também presentes no anel contráctil a Myo1 (miosina) e a Igp1 (IQGAP) (Luca *et al.*, 2001). Estas observações sugerem que estes mutantes apresentam o recrutamento normal dos componentes do anel de actomiosina, mas no entanto, não se observa a constricção deste. A questão que se punha era então saber se as cadeias de células eram o resultado de

defeitos citocinéticos ou de defeitos na formação do septo. A prova que estes mutantes originavam defeitos de citocinese, obteve-se quando se realizou um tratamento às cadeias de células observadas nos mutantes de Cdc15 e de Mob1, com zimolaze⁹ (Cdc15) ou com uma breve sonicação (Mob1). Se as cadeias de células fossem resultantes de defeitos na formação do septo, estes tratamentos resultariam na desagregação das mesmas. Por outro lado, se as cadeias de células fossem resultantes de defeitos citocinéticos não se deveria observar sua desagregação. Após a realização destas experiências continuou a observar-se as cadeias de células, o que confirmou o defeito citocinético.

Para além do envolvimento dos componentes da MEN na citocinese, a análise de dois outros mutantes, o mutante de Cdc15 (*cdc15-2*), e o duplo mutante *dbf2-2dbf20Δ*, resultou na conclusão que estes componentes estão também envolvidos na formação do septo. De facto, nestes mesmos mutantes observou-se também a formação de cadeias de células, no entanto, neste caso os defeitos observados são devidos à falha na formação do septo, e não à incapacidade da constrição do anel de actomiosina (Hwa – Lim *et al.*, 2002).

Todas estas observações resultaram numa melhor compreensão da função da MEN e dos seus componentes. Assim, a MEN para além de controlar a saída de mitose, parece ter também um papel importante na contracção do anel de actomiosina e na formação do septo, podendo provavelmente estabelecer uma interligação entre estes três fenómenos.

1.6.5 A SIN (Septation Initiation Network)

A SIN (Septation initiation Network) é uma cascata de sinalização semelhante a MEN, que foi identificada na levedura de fissão *S. pombe*. Ao contrário de MEN, a SIN não é essencial para a saída de mitose, sendo essencial para a constrição do anel de actomiosina e para a formação do septo.

A SIN é, como já referido, uma cascata de sinalização muito semelhante a MEN, na qual quase todos os seus componentes têm um homólogo em *S. cerevisiae* (tabela 1.1). Os componentes da SIN são a GTPase *spg1*, as cinases *cdc7*, *sid1*, *sid2*, e *plo1*, as proteínas associadas *cdc14*¹⁰ (associado a *Sid1*) e *mob1* (associado a *Sid2*), a GAP *cdc16-byr4* e as proteínas *cdc11* e *sid4* (possivelmente proteínas de ancoragem) (revisto em Bardin & Amon, 2001).

Mutações no genes pertencentes a SIN (excepto em *cdc16* e *byr4*) resultam no fenótipo característico dos genes pertencentes a esta cadeia de sinalização, que é o aparecimento de células alongadas e multinucleadas incapazes de formar um septo. Os únicos componentes da SIN que não apresentam esse fenótipo quando mutados, são os genes *cdc16* e *byr4*. Mutações nestes genes, resultam em vários eventos de septação na

⁹ Zimolaze - Enzima que degrada a parede celular. Se as células tiverem a citocinese completa o tratamento com a zimolaze separa as cadeias de células dando origem a células individualizadas.

¹⁰ Notar que a Cdc14 de *S. pombe* não está relacionada com a Cdc14 de *S. cerevisiae*

ausência de divisão nuclear, o que sugere que estas proteínas actuam antagonisticamente aos outros componentes da SIN.

Assim como na MEN, a sinalização através de SIN é também mediada por uma GTPase, a Spg1 (Schmidt *et al.*, 1997). A Spg1 localiza-se no SPB durante o ciclo celular e, na entrada em mitose dá-se a alternância de Spg1^{GDP} para Spg1^{GTP}. Após a sua activação, a Spg1 recruta a cinase Cdc7 para ambos os SPBs (Sohrmann *et al.*, 1998). Seguidamente, no início de anafase, o complexo GAP Cdc16-Byr4, que se localiza nos dois SPBs durante o todo ciclo celular, dissocia-se destes (Li *et al.*, 2000a). Esta assimetria resulta na conversão de Spg1^{GTP} para Spg1^{GDP} no SPB em que a GAP cdc16-Byr4 ainda está ligada; o que resulta na dissociação de Cdc7 do SPB que contém o complexo Cdc16-Byr4 (Sohrmann *et al.*, 1998; Cerutti & Simanis, 1999). Enquanto se dá o alongamento do fuso (em anafase B), a Cdc7 recruta o complexo Sid1-Cdc14 para o SPB (Guertin *et al.*, 2000). Interessantemente, este passo é dependente da inactivação da CDK mitótica - Cdc2 (Guertin *et al.*, 2000), o que permite a esta levedura estabelecer o elo de ligação entre a citocinese e a saída de mitose. A localização assimétrica de Sid1 (que é resultante da localização assimétrica de cdc7) promove a realocação do complexo Sid2-Mob1. Assim, o complexo Dbf2-Mob1, para além de continuar a localizar-se nos SPBs (como observado durante todo o ciclo celular), passa também a localizar-se no local de septação (Sparks *et al.*, 1999; Salaminova *et al.*, 2000; Hou *et al.*, 2000). Esta realocação do complexo Mob1-Sid2 na região mediana, resulta provavelmente na fosforilação de substratos chave nessa região, que poderá promover a constrição do anel de actomiosina e a septação.

Para além dos componentes descritos nesta cascata de sinalização, existem três outros componentes que são necessários para a actividade de SIN. Dois são as proteínas de ancoragem sid4 e cdc11. De facto, a ancoragem das proteínas pertencentes a SIN nos SPBs necessita dos produtos dos genes *sid4* e *cdc11*, o que faz destes componentes essenciais na SIN. O outro membro de SIN é a cinase Plo1, da família das cinases tipo polo (Cdc5 em *S. cerevisiae*); a Plo1 é essencial para a septação (Ohkura *et al.*, 1995) sendo que a sua sobreexpressão induz a formação de um septo em qualquer fase do ciclo celular. Esta septação desregulada obtém-se através do recrutamento de Cdc7 para os SPBs (Mulvihill *et al.*, 1999), resultando possivelmente na activação de SIN. A Plo1 actua provavelmente antes da Spg1, pois observou-se que a activação da Spg1 em leveduras mutantes para *plo1* induz septação ectópica. Um outro resultado que favorece esta hipótese é o facto da actividade de SIN ser necessária para induzir múltiplas septações aquando da sobreexpressão de *plo1* (Tanaka *et al.*, 2001).

A SIN é então uma cascata de sinalização que promove a septação e a citocinese em *S. pombe*. Como é óbvio, assim como a MEN, a SIN tem também de ter mecanismos de regulação que não permitam início da septação antes que se dê a segregação cromossómica.

1.6.6 Regulação de SIN

Para a manutenção da sua estabilidade genómica, é essencial que em *S.pombe* não inicie a septação enquanto o ponto-de-controlo de montagem do fuso ainda está activo. A proteína Cdc16 tem um papel central nesse mecanismo, visto que impede o início da septação quando este ponto-de-controlo está activo; por outro lado, quando se inactiva a Cdc16 em células que estão em metafase, observa-se a septação antes de se dar a segregação cromossómica (Fankhauser *et al.*, 1993).

Para além da relação entre o ponto-de-controlo de montagem do fuso e a septação, a SIN está também envolvida num outro mecanismo de ponto-de-controlo, o ponto-de-controlo de citocinese. Este ponto-de-controlo garante que a célula não inicia uma nova mitose se, a septação e a citocinese não foram correctamente finalizadas no ciclo celular anterior. Este ponto-de-controlo foi descoberto após a identificação de mutações no gene *csp1/dcr1* (que gene codifica para uma enzima necessária para a síntese do septo). Nas células mutantes em *csp1/dcr1* não se observa a septação, mas sim a replicação do DNA, seguida de um bloqueio em G2 antes do início da próxima mitose. Esta paragem antes de mitose é dependente das proteínas Wee1, Clp1/Flp1 e da cascata de sinalização SIN (são todas necessárias para manterem baixos os níveis de actividade da CDK1, e desta forma impedirem a entrada em mitose).

Assim como a MEN, a SIN também actua sobre uma fosfatase, a Clip1/Flp1. A fosfatase Clip1/Flp1, que é homóloga à fosfatase Cdc14 de *S. cerevisiae*, é libertada no início de mitose independentemente da actividade de SIN. No entanto, a actividade da SIN é necessária para manter a Clip1/Flp1 fora do nucléolo. A fosfatase Clip1/Flp1 impede a entrada prematura em mitose por inactivação da Cdc2 (Cdk1 de *S. pombe*), por inibição da fosfatase Cdc25, e por activação da cinase Wee1 (Liu *et al.*, 1999; Le Goff *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000).

Assim, a SIN actua e é regulada em diferentes níveis: estabelece a ligação entre a segregação cromossómica e o início da formação do septo, e impede o início de uma nova mitose se se detectarem defeitos de septação no ciclo celular anterior.

1.6.7 SIN e MEN, diferenças e semelhanças

Mas, quais são os pontos comuns entre a MEN e a SIN?

Uma primeira abordagem destas cascatas de sinalização poderia indicar mais diferenças do que semelhanças, visto que:

- A SIN regula a formação do septo após a inactivação das ciclinas mitóticas.
- A MEN controla a inactivação das ciclinas mitóticas e a saída de mitose.

No entanto, todos os homólogos da MEN (*S. cerevisiae*) que se encontraram em *S. pombe* fazem parte da SIN (tabela 1.1). Esta observação sugere a existência de algum paralelismo entre as duas cascatas de sinalização.

Mas, a MEN não é só necessária para a inativação das ciclinas mitóticas. Como foi já descrito, as proteínas da MEN também têm uma função em controlar a citocinese, estando envolvidas na contracção do anel de actomiosina e na formação do septo.

Por outro lado, a SIN é necessária para manter uma actividade baixa da Cdc2 quando o ponto-de-controlo que controla a citocinese está activado. A fosfatase Clp1/Flp1 (homóloga da Cdc14 de *S. cerevisiae*) é libertada do nucléolo no início da mitose, sendo esta libertação independente da actividade de SIN. No entanto, a SIN é necessária para manter a Clp1/Flp1 fora do nucléolo quando o ponto-de-controlo de citocinese está activado. Este resultado contrasta com o que se observa em *S. cerevisiae*, onde a MEN é necessária para libertar a Cdc14 do nucléolo. No entanto, a cadeia de sinalização FEAR, promove a libertação inicial da Cdc14 do nucléolo (no início da anafase), e esta libertação é independente da actividade da MEN. Assim, a MEN é necessária para libertar a Cdc14 do nucléolo (em anafase tardia) e para *manter* esta proteína fora do nucléolo (o que é análogo ao que se observa em *S. pombe*).

Uma outra semelhança entre estas cascatas de sinalização é que ambas as fosfatases Clp1/Flp1 e Cdc14 promovem a inativação das ciclinas mitóticas. No entanto, a Clp1/Flp1 promove a inativação da Cdc2 por fosforilação, enquanto que a Cdc14 promove a degradação das ciclinas mitóticas.

	<i>S. Cerevisiae</i> (MEN)	<i>S. Pombe</i> (SIN)	Mamíferos (MEN/SIN?)
GTPase	Tem1	Spg1	?
Cinases	Cdc5 Cdc15 Dbf2	plo1 cdc7 Sid2 sid1	Família das cinases polo ? Rock, Ndr, Citron, Lats/warts ?
Função desconhecida	Mob1	mob1 cdc14	Família dos genes tipo Mob ?
Fosfatases	Cdc14	clip1/flip1	hCdc14A, hCdc14B
GAP	Bub2 Bfa1/Byr4	Cdc16 byr4	? ?
GEF	Lte1	?	?
Estrutural	Nud1	Cdc11 Sid4	Centriolina ?

Tabela 1.1 – Componentes das cascatas de sinalização MEN e SIN e os homólogos já identificados em eucariotas superiores.

Assim, e apesar de MEN e SIN serem diferentes, estas cascatas de sinalização parecem ter a mesma final função em *S. pombe* e em *S. cerevisiae*: ambas promovem a inactivação das CDks mitóticas e a citocinese. Além disso, ambas as cascatas de sinalização controlam uma fosfatase (Clp1/Flp1 e Cdc14) que inibe as CDKs mitóticas (não esquecendo no entanto que as estratégias utilizadas pela MEN e pela SIN para alcançarem o mesmo objectivo são diferentes).

1.7 Os genes Mob

1.7.1 Mob1 de *S. cerevisiae*

O gene *MOB1* (Mps One Binder) foi inicialmente identificado na levedura *S. cerevisiae* após um rastreio de duplo híbrido, numa busca de proteínas que interagissem com a cinase Mps1 (Luca & Winey, 1998). A Mob1 interage física e geneticamente com a Mps1, e é uma fosfo proteína *in vivo*, sendo um substrato *in vitro* da Mps1 (Luca & Winey, 1998). A cinase Mps1 é essencial para a duplicação do SPB e para o ponto-de-controlo de montagem do fuso. No entanto, apesar de se ter observado a interacção entre a Mob1 e a Mps1, a Mob1 não parece ser necessária quer para a duplicação dos centrossomas quer para o ponto-de-controlo de montagem do fuso.

Um outro interactuante da Mob1 que também foi identificado através de um rastreio de duplo híbrido (e por experiências de *pull –down*) foi a cinase Dbf2 (Komarnitsky *et al.*, 1998). A Dbf2 é uma proteína que também pertence à MEN. O facto da sobreexpressão de Mob1 suprimir o fenótipo característico de MEN observado em leveduras que têm uma deleção para o gene *DBF2*, sugere que a Mob1 actua através de Dbf2 (Komarnitsky *et al.*, 1998). Consistente com esta hipótese, observou-se que a interacção entre as proteínas Dbf2-Mob1 é essencial para a completa activação de Dbf2 pela cinase Cdc15 (e consequentemente para a saída de mitose) (Mah *et al.*, 2001).

O *MOB1* é um gene essencial e leveduras mutantes em *MOB1* apresentam uma paragem em anafase tardia, com elevados níveis de ciclina B não degradada, com o fuso mitótico completamente alongado, e com os cromossomas já segregados (Luca & Winey, 1998). Devido ao fenótipo observado nos mutantes de *MOB1*, este gene foi identificado como pertencente a MEN. Para além deste fenótipo característico dos genes pertencentes a MEN, identificaram-se ainda outros alelos de *MOB1* (exp.: *mob1-83*) nos quais as células faziam vários ciclos de duplicação de DNA sem no entanto executarem a citocinese, o que originava a formação de cadeias de células interligadas (Luca *et al.*, 2001). O anel contráctil nestes mutantes parece normal visto que é possível detectar a actina, a Myo1 (miosina) e a Igp1 (IQGAP) correctamente localizadas. No entanto, apesar do recrutamento dos componentes do anel contráctil ser aparentemente normal, não se observa a constrição do

mesmo, o que resulta na falha da citocinese (Luca *et al.*, 2001). A Mob1 localiza-se no SPB, e após a activação da MEN é também detectada no pescoço da gémula (Luca *et al.*, 2001), sendo esta localização consistente com uma possível função citocínica para esta proteína.

1.7.2 Mob1 de *S. pombe*

O gene Mob1 da levedura *S. pombe* (homólogo ao gene Mob1 de *S. cerevisiae*) foi identificado simultaneamente por dois grupos que utilizaram duas abordagens experimentais diferentes: através de um rastreio genético de mutantes de septação, e através de um rastreio de duplo híbrido na procura de proteínas que interagem com Sid2 (homólogo de Dbf2 de *S. cerevisiae*) (Salimova *et al.*, 2000; Hou *et al.*, 2000). A Mob1 e a Sid2 co-localizam nos SPBs durante a mitose e, após a activação de SIN, localizam-se também no local de septação. A Mob1 tem associada a si uma actividade cinásica, que não é detectada em leveduras mutantes em *sid2* (*sid2-250*), mas permanece inalterada em leveduras mutantes em *mph1* (*mph1Δ* - o homólogo de *MPS1* neste organismo) (Hou *et al.*, 2000). Estes resultados sugerem que a Sid2 é a responsável pela actividade cinásica associada a Mob1.

A interacção de Mob1 com o homólogo de Mps1 em *S. pombe* (Mph1) não foi detectada por nenhum dos grupos que clonou este gene. Esta observação levanta dúvidas relativamente à conservação dessa interacção no reino eucariótico.

Assim como o seu homólogo de *S. cerevisiae*, o *mob1* de *S. pombe* é também um gene essencial (Salimova *et al.*, 2000; Hou *et al.*, 2000). As células mutantes em *mob1* apresentam o recrutamento normal dos componentes de actomiosina, mas não conseguem formar um septo e falham a citocinese, originando a formação de células multinucleadas (Salimova *et al.*, 2000; Hou *et al.*, 2000). É de notar que o mutante *mob1* de *S. pombe* não apresenta qualquer defeito de saída de mitose (o que é característico de um gene pertencente a SIN), sendo apenas necessário para a citocinese. Para além disso, a sobreexpressão de *mob1* origina defeitos na mitose e na septação, observando-se células nas quais se forma um septo fino e aberrante, ou células com múltiplos septos (Salimova *et al.*, 2000), o que sugere também uma função desta proteína na citocinese e formação do septo.

Em conclusão, o gene *mob1* de *S. pombe* codifica para uma proteína que tem uma função essencial na promoção da septação deste organismo.

1.7.3 Mob2 de *S. cerevisiae*

Aquando da identificação de *MOB1*, um segundo gene pertencente à família de *MOB1*, designado de *MOB2* (Luca & Winey, 1998). No entanto, e ao contrário do observado para o *MOB1*, as leveduras que apresentam uma deleção em *MOB2* são viáveis, o que

indica que este gene não é essencial (Luca & Winey, 1998). Assim como para o *MOB1*, detectou-se também para o *MOB2* uma interacção genética com o *MPS1*. No entanto, após a deleção de *MOB2*, o ponto-de-controlo de montagem do fuso funciona normalmente em *S. cerevisiae*, o que levanta dúvidas relativamente à importância biológica desta interacção.

Observou-se (em ensaios de duplo híbrido e de imunoprecipitação) que a proteína Mob2 interage fisicamente com a Cbk1 (uma cinase tipo Dbf2) (Racki *et al.*, 2000; Colman-Lerner *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 2002) e pensa-se que a actividade da cinase Cbk1 necessita da presença de Mob2. Durante o crescimento polarizado, ambas as proteínas (Mob2 e Cbk1) têm uma localização interdependente no córtex da gémula, localizando-se ainda no pescoço da gémula no final da mitose (Weiss *et al.*, 2002). Relacionado com o facto da Mob2 ter uma função no crescimento polarizado, as leveduras mutantes em *MOB2* têm uma morfologia mais redonda do que as leveduras normais (o que sugere que a polarização do citoesqueleto está afectada nestes mutantes). Interessantemente, a localização de Mob2 no pescoço da gémula depende da Mob1 e da Cdc14, indicando que a MEN actua anteriormente a Mob2 (Weiss *et al.*, 2002).

Após a citocinese, as leveduras mutantes em *MOB2* são incapazes de finalizarem a separação física entre as duas células filhas; o septo de chitina que se forma entre a célula mãe e a célula filha não é degradado, o que resulta na formação de agregados celulares (Weiss *et al.*, 2002). O complexo cinásico Cbk1/Mob2 actua sobre o factor de transcrição Ace2; e este promove a transcrição de genes envolvidos na separação das células mãe e filha após a citocinese (Colman-Lerner *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 2002).

1.7.4 Mob2 de *S. pombe*

Assim como na levedura *S. cerevisiae*, a *S. pombe* também contém no seu genoma a sequência de um segundo gene da família de *mob1*. No entanto, e ao contrário do observado em *S. cerevisiae*, em *S. pombe* o *mob2* é um gene essencial. As leveduras mutantes neste gene são esféricas (em vez de cilíndricas), e têm o citoesqueleto de actina e de microtúbulos despolimerizado. Para além destes efeitos, a redução dos níveis de expressão de *mob2* origina ainda defeitos na activação do crescimento bipolar da *S. pombe*, e devido a isso as células são, no momento da divisão, menores do que o normal. Contrariamente ao observado para a sua inibição, a sobreexpressão de *mob2* provoca um atraso no início da mitose; assim, antes da divisão, essas células têm dimensões superiores ao normal. Esta proteína localiza-se na periferia da célula e no citoplasma durante o ciclo celular, e ainda, no local de septação em citocinese.

Análogo ao que acontece em *S. cerevisiae*, a proteína Mob2 de *S. pombe* também interage com uma cinase tipo Dbf2, a cinase Orb6. E, sugestivo de uma função semelhante para estas duas proteínas, as leveduras mutantes em *orb6* e em *mob2* apresentam o mesmo fenótipo. O complexo cinásico Orb6/Mob2 tem assim uma função essencial em *S.*

pombe relacionada com a coordenação do crescimento polarizado durante a interfase e no início da mitose (Hou *et al.*, 2003).

1.7.5 A função dos genes Mob

Os genes da família MOB codificam para proteínas cuja função é, a nível bioquímico ainda desconhecida. Para além disso, estas proteínas não apresentam domínios específicos que possam sugerir pistas relativamente às suas funções. No entanto, uma característica comum a todas as Mobs é a sua associação a cinases tipo Dbf2. É possível que as proteínas Mobs actuem como co-factores de cinases tipo Dbf2.

1.7.6 Os homólogos dos genes Mob em eucariotas superiores

A descodificação dos genomas de diversos organismos eucariotas superiores permitiu a identificação de vários genes tipo Mob, encontrando-se dispersos por todo o reino eucariótico. Relacionado com um aumento de complexidade dos genomas em eucariotas superiores está o facto de nestes se encontrarem mais do que dois genes tipo Mob.

No caso do verme *C. elegans*, encontram-se depositadas na base de dados de ESTs, sequências que codificam para quatro genes tipo Mob. No entanto, até à data só foram publicadas estudos num desses genes¹¹. A análise em embriões de *C. elegans*, dos efeitos resultantes da depleção de Ce-Mob1 (por RNAi) não permitiu a identificação de nenhum fenótipo (Gruneberg *et al.*, 2002). No entanto, uma vez que esta análise foi, realizada em embrião, poderá o Ce-Mob1 actuar num estádio mais avançado do desenvolvimento deste organismo. Para além disto, os autores do trabalho não demonstraram a eficiência os níveis de depleção. No entanto, é também possível que os diferentes genes tipo *MOB1* sejam redundantes, e que por essa razão não se observe fenótipo na depleção simples de Ce-Mob1.

1.7.6.1 Os genes Mob humanos

O genoma humano codifica para sete genes tipo Mob (Florindo & Tavares, Human Genome Data Base, direct submission, 2003) cuja função é desconhecida, sendo a descrição pormenorizada dos genes tipo Mob humanos apresentada adiante. Actualmente, as informações publicadas sobre as proteínas tipo Mob humanas são muito escassas, tendo sido já no decorrer deste trabalho, sido publicado o gene Mob1.

O gene Mob1 foi também denominado de phocein, codifica para uma proteína que se localiza no Complexo de Golgi (Moreno *et al.*, 2001; Baillat *et al.*, 2001) e que interage com

¹¹ O gene tipo Mob1 publicado em *C.elegans* é semelhante ao hsMob4 apresentado na tese.

a fosfatase PP2A (Moreno *et al.*, 2001). Observou-se que, em fibroblastos de ratinho, nos quais a actividade da fosfatase PP2A está inibida, a Mob1 está fosforilada; este resultado sugere que a PP2A esteja envolvida na desfosforilação da Mob1 (Moreno *et al.*, 2001).

A função da Mob1 é ainda desconhecida, sugerindo os autores que esta proteína possa modular interacções entre o citoesqueleto e as membranas celulares.

1.8 Existe uma cascata semelhante a MEN e SIN em eucariotas superiores?

Uma indicação de que existe uma cascata semelhante a MEN e a SIN em organismos eucariotas superiores é a observação da existência de homólogos de vários componentes das cascatas nestes organismos (Tabela 1.1).

1.8.1 Os homólogos a MEN e SIN em eucariotas superiores

1.8.1.1 As fosfatases tipo Cdc14

Em *C. elegans* existe um gene que codifica para uma proteína homóloga à Cdc14 de *S. cerevisiae*. Este é um gene essencial, causando a sua depleção letalidade embrionária (Gruneberg *et al.*, 2002). A depleção da Ce-CDC14 (por RNAi) resultou na conclusão que esta proteína seria necessária para a citocinese, mas que, no entanto, seria dispensável para a progressão mitótica nos primeiros ciclos embrionários. Como resultado da depleção de *CDC14*, os embriões não formam a zona mediana do fuso, e algumas proteínas que normalmente se localizam nesta estrutura estão deslocalizadas (exp. ZEN-4 e CYK4¹²); as falhas de citocinese vão resultar na formação de embriões multinucleados. Em contraste com os seus homólogos de levedura, a Ce-CDC14 não se localiza nem no núcleo, nem nos centróssomas. De facto, esta proteína não apresenta nenhuma localização específica em interfase, mas concentra-se na zona mediana do fuso em anafase e no midbody em telofase. (Todos os resultados apresentados estão descritos em Gruneberg *et al.*, 2002).

O genoma do *H. sapiens* codifica para duas proteínas tipo CDC14, denominadas de hCdc14A e de hCdc14B (Li *et al.*, 1997). Ambas as Cdc14 humanas interagem com a proteína supressora de tumor p53, desfosforilando-a (Li *et al.*, 2000). Para além da sua interacção com a p53, pouco se sabe sobre a hCDC14B, sendo as restantes informações

¹² CYK4- é uma Rho Gap necessária para a citocinese em *C. elegans*.

ZEN4 – é o homólogo de MKPL1 (cinesina motora necessária para a formação da zona mediana do fuso e para a citocinese).

disponíveis relativas à sua localização celular, indicativas de que a hCDC14B é uma proteína nucleolar (Mailand *et al.*, 2002).

A proteína hCDC14A, tal como o seu homólogo de levedura, também desfosforila a hCdh1, o que resulta na activação do complexo APC^{Cdh1} (sugerindo que a hCDC14A possa também regular a saída de mitose em células de mamífero) (Bembenek & Yu, 2001). A proteína hCDC14A localiza-se nos centrossomas das células em interfase (Mailand *et al.*, 2002; Kaiser *et al.*, 2002). Consistente com uma função centrossomal, a sua sobreexpressão resulta numa separação prematura dos centrossomas e na formação de fusos mitóticos supranumerários (Mailand *et al.*, 2002). A sobreexpressão da hCDC14A causa ainda uma segregação anormal dos cromossomas e defeitos de citocinese (Mailand *et al.*, 2002; Kaiser *et al.*, 2002). Em contraste com estes resultados, a depleção de hCDC14A (por RNAi) não permite a separação dos centrossomas, e as células não conseguem realizar uma citocinese produtiva (Mailand *et al.*, 2002).

Assim, a hCDC14A está em células humanas provavelmente envolvida na promoção da citocinese, mas terá também uma segunda possível função na duplicação dos centrossomas.

1.8.1.2 As cinases tipo Dbf2

Numa busca nas bases dos genomas de organismos eucariotas superiores, não foi possível encontrar homólogos óbvios para a cinase Dbf2. Há no entanto, genes que apresentam homologia significativa. Assim, as cinases tipo Dbf2 em eucariotas superiores dividem-se em três grandes grupos: as cinases tipo NDR (Nuclear Dbf2-Related), as cinases tipo LATs/WARTS (Large Tumor Suppressor) e as cinases tipo ROCK. No ramo das cinases tipo NDR encontram-se as cinases de mamíferos NDR1 e NDR2, a cinase TRICORNED de *Drosophila*, e a cinase Sax-1 de *C.elegans*. No ramo das cinases tipo LATS/WARTS encontram-se a hsLATS1 e hsLATS2, a LATS de *Drosophila* e a LATS de *C.elegans* e, por último, as cinases tipo Rock, que são as que se encontram evolutivamente mais distantes (revisto em Tamaskovic *et al.*, 2003).

A informação sobre as cinases tipo NDR é escassa, sendo a sua função desconhecida. As informações disponíveis indicam que ambas se localizam no núcleo (Millward *et al.*, 1995) e ainda, que a NDR-1 é regulada por fosforilação *in vivo* (Millward *et al.*, 1999).

A cinase LATS1 (de mamíferos) localiza-se nos centrossomas em interfase, no fuso mitótico em metafase, e no midbody em telofase (Nishiyama *et al.*, 1999). A LATS-1 é fosforilada durante o ciclo celular e interage com a cinase CDK1 no início da mitose (Nishiyama *et al.*, 1999). A LATS1 é possivelmente um regulador negativo da CDK1 visto

que, quando associada a esta cinase, a CDK1 não se associa a nenhuma ciclina, nem apresenta actividade cinásica sobre a histona H1 (Tao *et al.*, 1999).

A sobreexpressão de LATS provoca uma diminuição dos níveis das ciclinas mitóticas A e B, e reduz de uma forma dramática a actividade da CDK1, o que causa uma paragem do ciclo celular na fase G2/M. Para além disso, a sobreexpressão de LATS/WARTS promove também a apoptose (Xia *et al.*, 2002). Os ratinhos knock-out para o LATS/WARTs apresentam, entre outros fenótipos, o desenvolvimento de tumores nos tecidos moles e nos ovários (St John *et al.*, 1999). Todas estas observações sugerem que o LATS1 é um gene supressor de tumores, e que suprime a tumorigenicidade ao regular negativamente a proliferação celular e modulando a sobrevivência das células.

A cinase LATS2 tem também a capacidade de suprimir tumores. A sua sobreexpressão inibe a actividade do complexo cinásico ciclina E/CDK2, provocando uma paragem do ciclo celular na transição G1/S (Li *et al.*, 2003).

Desta forma, as cinases LATS1 e LATS2 regulam a proliferação celular nas células de mamíferos, regulando negativamente diferentes pontos-de-controlo do ciclo celular.

As cinases tipo ROCK são o parente distante das cinases tipo DBF2. Estas cinases estão envolvidas numa grande variedade de processos celulares, como por exemplo a formação de fibras de stress, a transformação celular, a fagocitose e a apoptose, a migração celular, e a citocinese e mitose (revisto em Riento & Ridley, 2003). Estão descritas em células de mamíferos duas cinases tipo ROCK: ROCKI e ROCKII (revisto em Riento & Ridley, 2003).

A ROCKI fosforila as cinases LIM1 e LIM2 (Maekawa *et al.*, 1999). Estas cinases estão envolvidas na regulação da dinâmica do citoesqueleto de actina, e a sua fosforilação por ROCK induz a reorganização deste.

A força motora do movimento celular provém da reorganização dinâmica do citoesqueleto de actina; esta é regulada pelas GTPases da família Rho (Rho, Rac e Cdc42). A Rac conjuntamente com a Cdc42, controla a formação dos lamelopodia; a Rho impulsiona a contracção da actomiosina, impulsionando o movimento celular. Dependendo da linha celular utilizada e das condições experimentais, os inibidores de ROCK podem inibir ou promover a migração celular. Mas, interessantemente, e sugerindo uma grande relevância biológica para a mobilidade induzida pela ROCK, esta cinase foi implicada no aumento da mobilidade celular observada durante a invasão dos tumores e na formação de metástases (revisto em Riento & Ridley, 2003).

A inibição da actividade de ROCK bloqueia a citocinese, e pensa-se que as ROCKs são necessárias para a contracção do sulco de clivagem. Relacionado com esta hipótese, está a observação de que ao utilizar o inibidor de ROCK, Y-27632, se ter verificado que a ROCK é necessária para a fosforilação da cadeia leve da miosina durante a citocinese

(revisto em Riento & Ridley, 2003). A Rock é também importante para a coesão dos centríolos, visto que a sua inibição (por RNAi e por utilização do Y-27632) provoca a separação dos centríolos em G1 (Chevrier *et al.*, 2002). A inibição de ROCK provoca ainda a migração prematura dos centríolos para o midbody em telofase tardia (Chevrier *et al.*, 2002).

1.8.1.3 As proteínas tipo Nud1

Um estudo muito recente identificou uma nova proteína humana, a centriolina, que tem um domínio de homologia com a proteína Nud1 de *S.cerevisiae* (Gromley *et al.*, 2003). A centriolina tem uma localização intracelular muito interessante: é uma proteína centrossomal durante o ciclo celular, e localiza-se apenas no centríolo mãe em telofase.

A depleção de centriolina por RNAi causa falhas de citocinese, onde as células (HeLa, RPE-1 e U2OS) se mantêm ligadas por pontes intercelulares muito longas (e não homogêneas). Surpreendentemente, as células ficam ligadas durante tanto tempo que iniciam uma nova divisão formando sincícios de células interligadas. A depleção de centriolina em células RPE-1 causa ainda um bloqueio em G1/G0.

Consistente com uma possível conservação da MEN em células de mamíferos, verificou-se em ensaios de duplo híbrido que a centriolina interage com a proteína Bub2 de *S. cerevisiae* (Gromley *et al.*, 2003).

Este estudo sugere a existência de um mecanismo promotor da citocinese em eucariotas superiores, do qual a centriolina é um dos componentes.

Curiosamente, muitos dos homólogos de MEN/SIN descritos apresentam, em células de mamífero, uma localização centrossomal. Esta observação levanta a hipótese de os centrossomas terem, tal como os SPBs das leveduras, uma função central no recrutamento das proteínas que controlam a citocinese, e ainda, na promoção deste mesmo evento celular.

1.9. O centrossoma e a citocinese

1.9.1 O centrossoma

Os centrossomas foram descritos em 1875 por Walter Fleming, e foram baptizados em 1888 por Theodor Boveri de centrossomas, devido à sua posição central na célula.

Os centrossomas são o único organelo da célula que não tem membrana. São constituídos por duas estruturas principais: os centríolos e o material pericentriolar. Um centríolo é um cilindro que é constituído por nove conjuntos de triplete de microtúbulos.

Cada centrossoma contém dois centríolos, que se encontram juntos numa das extremidades (a extremidade proximal), formando um ângulo recto. Um dos centríolos tem apêndices extra na extremidade mais afastada (a extremidade distal), sendo este o centríolo mãe. Pensa-se que os centríolos se mantêm juntos devido à acção de um ligando intercentriolar, cuja identidade é ainda obscura. A rodear os dois centríolos encontra-se o material pericentriolar, sendo este o local de nucleação dos microtúbulos. (figura 1.5) Os centrossomas são o centro organizador da nucleação de microtúbulos na maioria das células.

Os centrossomas sofrem uma duplicação semi-conservativa, duplicando-se uma vez por cada ciclo celular. Em G1/S os centrossomas separam-se e, durante a fase S, um novo centríolo (centríolo filho) cresce na vizinhança do anterior. Este vai alongar durante G2, e atinge a sua maturidade no fim de G2/início de mitose. Na transição G2/M, os centrossomas separam-se num passo que envolve dois processos: inicialmente, a cinase Nek-2 promove a quebra do elo de ligação entre os centrossomas que se duplicaram; seguidamente, os centrossomas afastam-se pela acção de proteínas motoras. Por fim, em mitose, os centrossomas participam na organização do fuso mitótico (figura 1.6) (Revisto em Doxsey, 2001).

1.9.2 O centrossoma e a citocinese

Apesar de inicialmente se ter atribuído aos centrossomas como principal função a nucleação de microtúbulos e de organização do fuso mitótico, estudos muito recentes indicam que os centrossomas também são importantes para a finalização da citocinese e progressão por G1.

Observou-se surpreendentemente que, se a uma célula em interfase ou células em mitose (profase), forem removidos os centrossomas (com microagulhas ou por laser), a célula consegue ainda formar o fuso mitótico e segregar os cromossomas em anafase (Hinchcliffe *et. al.*, 2001; Khodjakov *et al.*, 2000). No entanto, as células filhas ficam ligadas por pontes intercelulares, e em aproximadamente 50% dos casos a citocinese falhava, formando-se células binucleadas (Khodjakov & Rieder, 2001). Os resultados obtidos nestas experiências permitiram concluir que, para além da função nucleadora dos microtúbulos, os centrossomas têm também uma função na citocinese, assegurando a fidelidade deste processo.

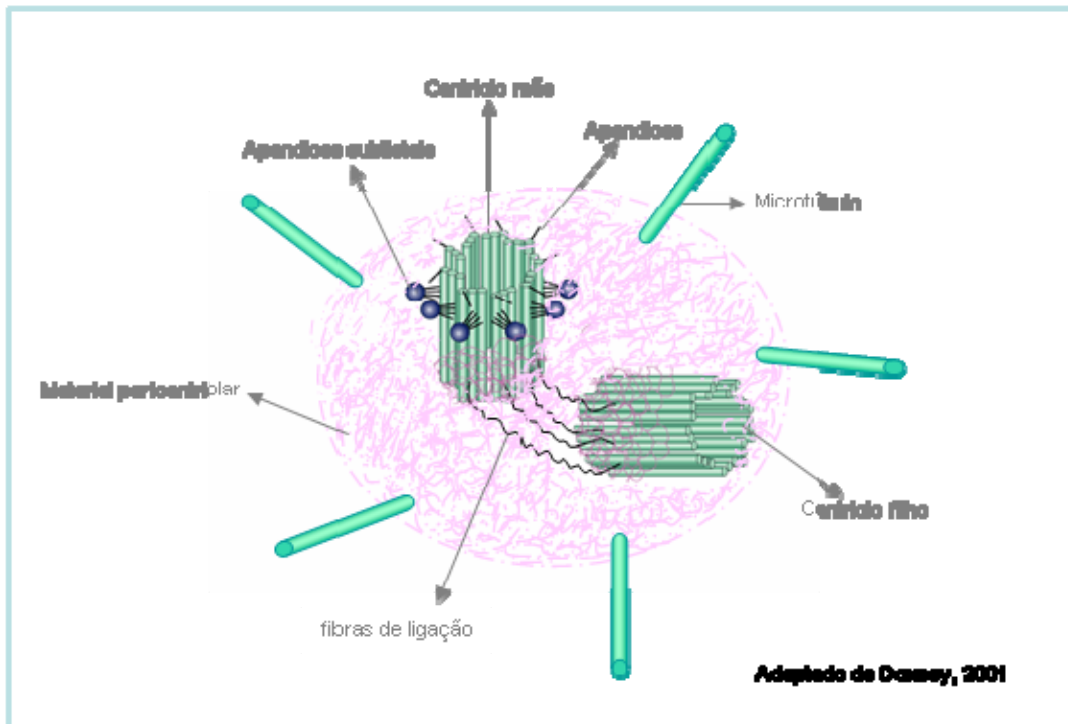


Figura 1.5 - Representação esquemática da estrutura do centríolo.

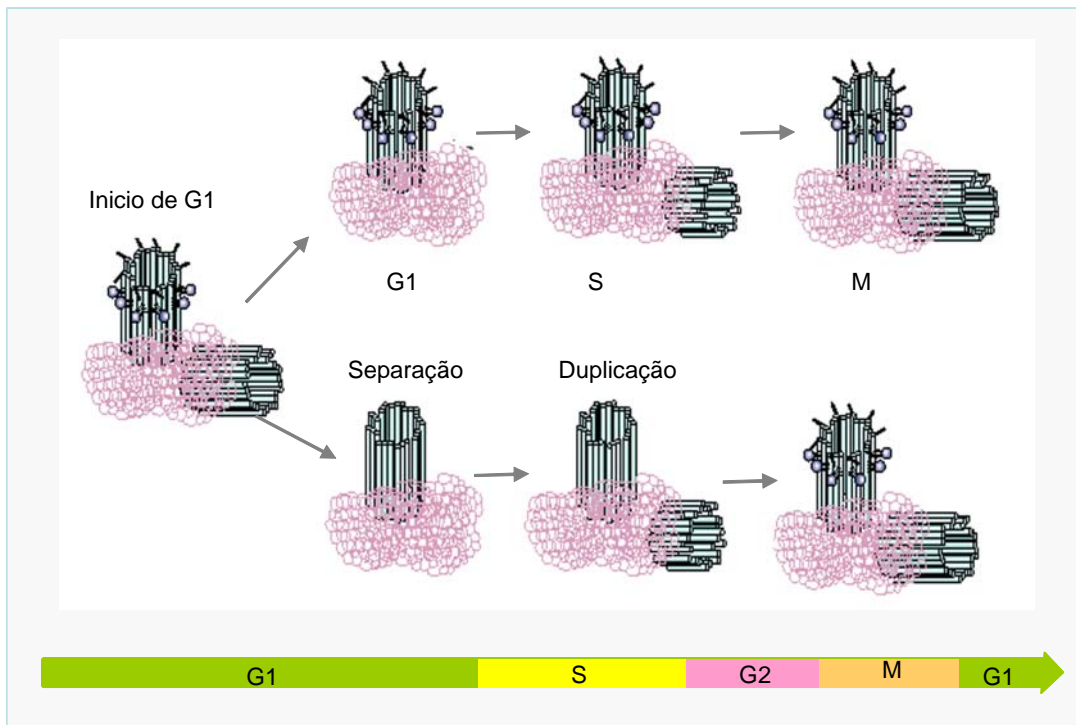


Figura 1.6 – Ciclo de duplicação dos centríolos.

De facto, a sinalização da citocinese em células de mamífero parece ser comandada pelo centríolo mãe. Em dois estudos muito interessantes, o grupo de Michel Bornens observou que em telofase os centríolos se separam, e que o centríolo filho apresenta um movimento errático dentro da célula durante algum tempo, durante o qual o centríolo mãe mantém a sua posição central (Piel *et al.*, 2000). Seguidamente, estes mesmos autores observaram que, para que as células completem o evento final da citocinese (a clivagem), o centríolo mãe tem que se aproximar do midbody e regressar novamente para o centro da célula (Piel *et al.*, 2001). Quando este inicia o movimento de regresso ao centro da célula, ocorre a clivagem (Figura 1.7). Estes autores observaram ainda que condições adversas ao movimento do centríolo mãe para o midbody causam um atraso de citocinese. Os resultados destas experiências culminaram na hipótese de que o centríolo mãe tivesse ancorado um mecanismo regulatório que controla os passos finais da divisão entre duas células. Este seria análogo ao descrito para as leveduras, que contêm ancorado no seu SPB (o equivalente de centrossomas nestes organismos) mecanismos que controlam a saída de mitose e a citocinese.

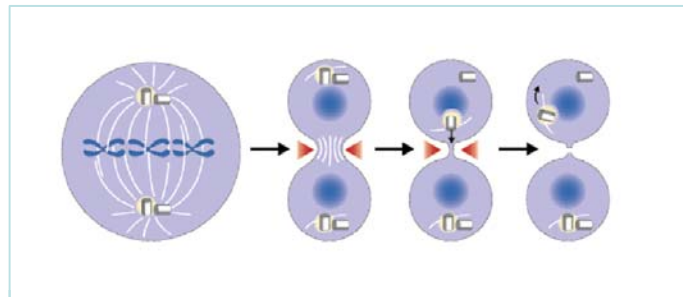


Figura 1.7 - O centríolo mãe como promotor da citocinese em eucariotas superiores.

1.10 A técnica de RNAi (RNA Interference)

A capacidade de deplectar células humanas de um mRNA sem obter efeitos inespecíficos foi apenas publicada em Maio de 2001 (Elbashir *et al.* 2001). Em 1998, Fire e os seus colegas descobriram que a injeção de dsRNA (RNA em cadeia dupla) em *C. elegans* era capaz de induzir o silenciamento específico de um gene (revisto em Dykxhoorn *et al.*, 2003). A esse mecanismo chama-se silenciamento de um gene após transcrição (PTGS- do inglês Post Transcriptional Gene Silencing). Pensa-se que o PGTS possa ter

evoluído de forma a interferir com a replicação viral, ou com a actividade de transposões, ou ainda para responder a outras formas inadequadas de expressão génica.

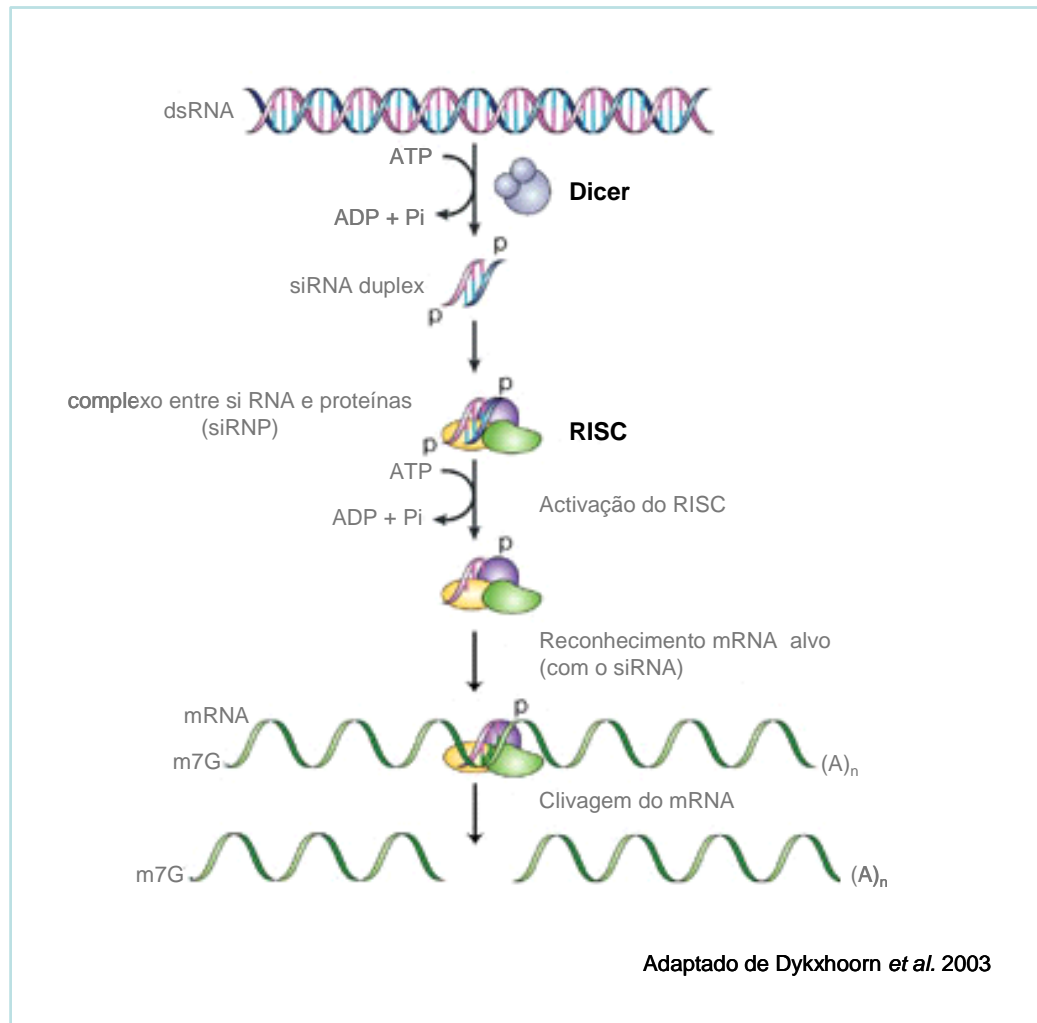


Figura 1.8 – Mecanismo de acção do RNA interference.

A observação que em *Drosophila* uma cadeia longa de dsRNA era clivada em pequenas moléculas de 21-22nt de RNA com a capacidade de induzir o processo de silenciamento pós transcricional, levou à conclusão (após experiências complementares) que a regulação do silenciamento pós-transcrição é induzida por pequenas moléculas de RNA em cadeia dupla de 21-25 nucleotídeos (revisto em Dykxhoorn et al., 2003). Actualmente, aceita-se que o mecanismo de silenciamento dos genes é causado pela activação da enzima Dicer (uma RNase), que cliva a cadeia longa de dsRNA para produzir siRNAs. Estes siRNAs são incorporados num complexo multiproteico chamado de RISC (RNA inducing silencing complex – complexo da indução do silenciamento por RNAs). O siRNA é separado e a cadeia anti-sense vai guiar o complexo RISC para o seu RNA

homólogo (alvo) e induzir a clivagem do mRNA (figura 1.8) (revisto em Dykxhoorn *et al.*, 2003).

Em mamíferos, a introdução de uma sequência de RNA com mais de 30 pb induz uma resposta inespecífica. Essa resposta inespecífica é devida à activação da cinase PKR, que fosforila o factor de iniciação da transcrição eIF2 α , originando uma inibição geral da transcrição (revisto em Dykxhoorn *et al.*, 2003). A observação destes efeitos punha, como é óbvio, limitações ao uso da técnica de silenciamento pós-transcricional em células de mamífero.

Em Maio de 2001, Tuschl e os seus colaboradores verificaram que era possível induzir o silenciamento específico de um gene em células de mamíferos se as células fossem transfectadas directamente com *duplexes* de RNA de 21 nucleotídeos (siRNAs) (Elbashir *et al.* 2001). Assim, para deplectar uma linha celular de mamíferos de uma determinada proteína (A), teríamos que transfectar as células com siRNAs desenhados contra o mRNA de A (com o objectivo de degradar o mRNA endógeno respectivo). Se se esperar o tempo suficiente para que haja “turn-over” completo da proteína A, como não há mRNA celular para repor os níveis endógenos da proteína A, a célula em questão fica deplectada nessa proteína.

Neste trabalho, utilizou-se a técnica de RNAi tal como descrita pelo Dr. Tuschl e os seus colaboradores (Elbashir *et al.* 2001).

Este trabalho teve como objectivo elucidar os processo de citocinese em células humanas, investigando a possível conservação de uma cascata de sinalização semelhante a MEN/SIN em eucariotas superiores. O estudo incidiu nos genes tipo Mob em células humanas. Após a observação inicial de que o genoma humano codifica para sete genes tipo Mob, concentrámos a nossa atenção nos genes Mob4A e Mob4B, que são os que apresentam maior homologia o Mob1 de levedura.

2. Materiais e Métodos

2.1 Material Biológico

2.1.1 Estirpes bacterianas

Para a realização deste trabalho foram utilizadas as estirpes bacterianas de *Escherichia coli*, DH5 α e XL1-Blue (para subclonagens de DNA), e a estripe BL21(DE3) (para expressão heteróloga de proteínas em bactéria).

	Genótipo	Referência
DH5 α	supE44 Δ lacU169(ϕ 80lacZ) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Sambrook & Russel, 2001.
XL1-Blue	supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thirelA1lac ^r	Sambrook & Russel, 2001.
BL21(DE3)	hsdS gal (λ Its857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)	Sambrook & Russel, 2001. (Novagen)

Tabela 2.1 - Genótipo das estirpes de *Escherichia coli* utilizadas.

2.1.2 Linhas celulares de mamíferos

As linhas celulares de mamíferos foram cultivadas em atmosfera húmida a 37°C com 5% de CO₂. A subcultura foi realizada duas a três vezes por semana, quando a confluência das células atingia aproximadamente 90%. As condições de subcultura, de acordo com a linha celular, apresentam-se na tabela 2.2.

	Meio de cultura	Referência
HeLa	Meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 2 mM de Glutamina, 1 mM Piruvato de Sódio	ATCC ¹
HeLa-Centrina	Meio RPMI suplementado com 10% de SFB, 2 mM de Glutamina.	(Piel et al., 2001)
Swiss 3T3	Meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 2 mM de Glutamina, 1 mM Piruvato de Sódio	ATCC
Hep-2	Meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 2 mM de Glutamina, 1 mM Piruvato de Sódio	ATCC

Tabela 2.2- Condições de subcultura das células de mamíferos.

2.1.3 Vectores

Utilizaram-se diferentes vectores consoante o objectivo das experiências (tabela 2.3).

¹ American Type Culture Collection

	Objectivo	Referência
pBluescript II KS	Subclonagem de DNA	Stratagene
Pet 22b	Expressão de proteínas em bactérias	Novagen
pGex-4t (1, 2 ou 3)	Expressão de proteínas em bactérias	Pharmacia Biotech
pcDNA3	Expressão de proteínas em células de mamífero.	Invitrogen
pcDNA6/V5-His (A, B ou C)	Expressão de proteínas em células de mamífero. A proteína é expressa em fusão com o epítipo V5.	Invitrogen
pcDNA3.1myc-His(-) (A, B. ou C)	Expressão de proteínas em células de mamífero. A proteína é expressa em fusão com o epítipo Myc	Invitrogen
pEYFPC1	Expressão de proteínas em células de mamífero. A proteína resultante está em fusão com a YFP.	Clontech
pEYFP-Tub	Expressão de α -tubulina humana em fusão com EYFP. Utilizado como marcador de co-transfecção em experiências de microscopia de tempo real.	Clontech

Tabela 2.3- Vectores utilizados.

2.1.4 cDNAs dos Mobs humanos

Os clones iniciais de hsMob1 (AW163637) e hsMob2 (BI755347 e BI7566494) foram gentilmente cedidos pelo RZPD². Os clones iniciais de hsMob3A (AA311606) e hsMob4A (AA374302) foram gentilmente cedidos pelo ATCC. Sequenciaram-se estes clones e as sequências apresentam-se no capítulo III. Os cDNAs de hsMob3B, hsMob3C e de hsMob4B foram obtidos por RT-PCR, realizado em RNA extraído de células HeLa, e os produtos clonados em pBluescript KS II. Utilizaram-se os seguintes pares de “primers”: InCF13/InCF14, InCF15/InCF16 e InCF17/InCF18 para se obter hsMob3B, hsMob3C e hsMob4B, respectivamente.

2.1.5 Oligonucleotídeos de DNA e RNA

Para a técnica de RNAi utilizaram-se oligos de RNA, que foram obtidos da Dharmachon, e desenhados de acordo com as indicações dos mesmos (tabela 2.4). Iniciou-se a escolha das sequências dos siRNAs 75 pares de bases (pb) após o codão de iniciação (ATG), procurou-se o primeiro dímero AA, e seleccionaram-se os 19 nucleotídeos seguintes a esse dímero. Seguidamente, calculou-se a percentagem de GC (guanidinas e citosinas) dessa sequência de 19 pb. A sequência ideal deverá ter um conteúdo GC de aproximadamente 50%. No entanto, pensa-se que sequências com um conteúdo de GC

² Resource Center of the German Human Genome Project

entre 30% a 70% poderão também ser eficientes. Após a selecção da sequência de interesse, utilizou-se numa pesquisa na base de dados do genoma humano. Essa pesquisa nos ESTs (sequência parcial de cDNA) da base de dados do genomas humano teve como objectivo garantir que a sequência escolhida só existia no mRNA do gene alvo.

A sequência alvo de hsMob4A difere 4 pb da sequência correspondente em hsMob4B. O inverso também é verdade para a sequência escolhida de hsMob4B em relação a hsMob4A.

Primers	Sequência (5'-3')	Características
InCF1 (hsMob1)	TAG <u>CCC GGG GGA TCC</u> GAA GGC CAA GAT GAA GGT GTG TGG	hsMob1 Dr. Locais de corte introduzidos <i>Sma I/BamHI</i>
InCF2 (hsMob1)	TAG <u>CCC GGG CGG CCG</u> CTC ATG CTT CAC TTT CCC CAG A	hsMob1 Rv. Locais de corte introduzidos <i>Sma I/Not I</i> Termina no codão STOP.
INCF3 (hsMob2)	TAG <u>GAT ATC GGA TCC</u> AGC TTG GCA CGA GGC GTT TTT C	hsMob2 Dr. Locais de corte introduzidos <i>EcoR V/BamHI</i>
InCF4 (hsMob2)	TAG <u>GAT ATC GCG GCC GCT</u> CAT CCT TCA CGT GGG TTT TGT G	hsMob2 Rv. Locais de corte introduzidos <i>EcoR V/Not I</i>
InCF5 (hsMob3A)	TAG <u>CCC GGG GGA TCC</u> CTC TCT GCG CCG CGC TAT ATG	hsMob3A Dr Locais de corte introduzidos <i>Sma I/ BamHI</i>
InCF6 (hsMob3A)	TAG <u>CCC GGG CGG CCG</u> CTC AGT GGC AGA TCC GCT CTG TC	hsMob3A Rv Locais de corte introduzidos <i>Sma I/Not I</i>
InCF7 (hsMob1)	TCC <u>CCC GGG GTC GAC</u> ATG GTC ATG GCG GAG GGG ACG	hsMob1 Dr Locais de corte introduzidos <i>Sma I/Sal I</i> Tem início na 1ª Met de hsMob1.
InCF9 (hsMob4A)	GGA <u>AGA TCT CAT ATG</u> AGC TTC TTG TTT G	hsMob4A Dr Locais de corte introduzidos <i>Bgl II/Nde I</i>
InCF10 (hsMob4A)	TGC <u>TCT AGA AAG CTT</u> TCT GTC TTT TGA GGT G	hsMob4A Rv Locais de corte introduzidos <i>Bgl II/Nde I</i> Retira o codão STOP
InCF11 (hsMob3A)	TAA <u>CTC GAG</u> ATG TCC AAC CCC TTC CTG	hsMob3A Dr Locais de corte introduzidos <i>Xho I</i> Tem início na 1ª Met de hsMob3A
InCF12 (hsMob3A)	TAA GAT ATC GTG GCA CAT CCG GGC GGT C	hsMob3A Rv Locais de corte introduzidos <i>EcoR V</i> Retira o codão STOP.
InCF13 (hsMob3B)	TAA <u>CTC GAG</u> ATG TCC ATA GCC CTG AAG	hsMob3B Dr Locais de corte introduzidos <i>Xho I</i> Tem início na 1ª Met de hsMob3B
InCF14 (hsMob3B)	TAA <u>GAT ATC</u> GTG ACA CAT CCT GCT CTG C	hsMob3B Rv Locais de corte introduzidos <i>EcoR V</i> Retira o codão STOP.
InCF15 (hsMob3C)	TAA <u>CTC GAG</u> ATG GCC CTG TGC CTG AAG	hsMob3C Dr Locais de corte introduzidos <i>Xho I</i> Tem início na 1ª Met de hsMob3C
InCF16 (hsMob3C)	TAA <u>GAT ATC</u> GTG GCA GAT CCG CTC TGT C	hsMob3C Rv Locais de corte introduzidos <i>EcoR V</i> Retira o codão STOP.
InCF17 (hsMob4B)	TCC <u>AAG CTT</u> ATG AGC TTC CTC TTC AGC	hsMob4B Dr Locais de corte introduzidos <i>Hind III</i> Tem início na 1ª Met de hsMob4B
InCF18 (hsMob4B)	TGC <u>GGA TCC</u> GGT AAC TGT GTT CTA G	hsMob4B Rv Locais de corte introduzidos <i>BamHI</i> Encontra-se fora de região codificante de hsMob4B (depois do codão STOP).
InCF19 (hsMob1)	ATC <u>CCC GGG CTC GAG</u> TGC TTC ACT TTC CCC AGA AAC TG	hsMob1 Rv Locais de corte introduzidos <i>Sma I / Xho I</i> Retira o codão STOP.

InCF20 (hsMob4B)	GAA <u>GAT ATC GGT ACC</u> ATG AGC TTC CTC TTC AGC AGC CGC	hsMob4B Dr Locais de corte introduzidos <i>EcoR</i> V/ <i>Kpn</i> I Tem início na 1ª Met de hsMob4B
InCF21 (hsMob4B)	TTC <u>GAT ATC AAG CTT</u> TCT GTC TTT TGA TCC AAG TTT CTC	hsMob4B Rv Locais de corte introduzidos <i>EcoR</i> V/ <i>Hind</i> III Retira o codão STOP.
InCF22 (hsMob4A)	GAA <u>GAT ATC GGT ACC</u> ATG AGC TTC TTG TTT GGT AG	hsMob4A Dr Locais de corte introduzidos <i>EcoR</i> V/ <i>Kpn</i> I Tem início na 1ª Met de hsMob4A
InCF23 (hsMob3A)	GAC <u>GAT ATC GTC GAC</u> ATG TCC AAC CCC TTC CTG AAG C	hsMob3A Dr Locais de corte introduzidos <i>EcoR</i> V/ <i>Sal</i> I Tem início na 1ª Met de hsMob3A
InCF24 (hsMob3A)	TAC GAT ATC GGA TCC TCA GTG GCA CAT CCG GGC GGT C	hsMob3A Rv Locais de corte introduzidos <i>EcoR</i> V / <i>Bam</i> H I Termina no codão STOP.
InCF25 (hsMob4A)	TCC <u>CCC GGG CTC GAG</u> ATG AGC TTC TTG TTT GGT AGT CG	hsMob4A Dr Locais de corte introduzidos <i>Sma</i> I / <i>Xho</i> I Tem início na 1ª Met de hsMob4A
InCF26 (hsMob4A)	TCC <u>CCC GGG GGA TTC</u> TTA TCT GTC TTT TGA GGT GAG	hsMob4A Rv Locais de corte introduzidos <i>Sma</i> I / <i>Bam</i> H I Termina no codão STOP.
InCF27 (hsMob4B)	GTC <u>GAT ATC CTC GAG</u> TTA TCT GTC TTT TGA TCC	hsMob4B Rv Locais de corte introduzidos <i>EcoR</i> V/ / <i>Xho</i> I Termina no codão STOP.
pEYFPC1	GAAGCG CGA TCA CAT GGT CCT GC	Para sequenciação de DNA clonado em pEYFPC1
pCDNA3.1 / BGHRevPr	CTA GAA GGC ACA GTC GAG G	Para sequenciação de DNA clonado em pcDNA6/V5-His (A, B ou C) e em pcDNA3.1/myc-Hys(-) (A, B ou C)
T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	Para sequenciação de DNA em diferentes vectores que continham o promotor T3
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Para sequenciação de DNA diferentes vectores que continham o promotor T7
Sp6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG	Para sequenciação de DNA diferentes vectores que continham o promotor Sp6
pGEX5'	GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG	Para sequenciação nos vectores pGEX4T
PEYFP-C1	GAA GCG CGA TCA CAT GGT CCT GC	Para sequenciação nos vectores pEYFPC1.

Tabela 2.4 - Oligonucleotídeos de DNA. As sequências de restrição que se introduziram artificialmente encontram-se sublinhadas.

	Sequência	RNA alvo
Oli1	ACA CGC AGA AGC CAC ACU U dT dT	hsMob4A
Oli2	CAC CUC CUU UAA GCA CUU U dT dT	hsMob4B
Oli3	CUG GAC UUC CAG AAG AAC AUC dT dT	Lam A/C (Elbashir <i>et al.</i> , 2001)
Oli5	CCA CCU GAA GGC CAA GAU G dT dT	hsMob1
FLUO RNAi	AGG UCU GGC UGA GAG UUU G dT dT	FANCE (Fanconi Anemia Protein E). Oligo fluorescente. A proteína FANCE não está envolvida na mitose.
Scramble duplex	GCG CGC UUU GUA GGA UUC G dT dT	Controlo negativo: a sequência alvo não existe no genoma humano.

Tabela 2.5 - Oligonucleotídeos de siRNA

2.1.6 Anticorpos

	anti-	gerado em	referência
GTU 88	γ -tubulina	Monoclonal ratinho	Sigma
γ-tubulina	γ -tubulina	Policlonal coelho	Sigma
Tub2.1	β -tubulina	Monoclonal ratinho	Sigma
DM 1A	α -tubulina	Monoclonal ratinho	Sigma
YL1/2	α -tubulina	Monoclonal ratazana	Serotec
Lam A/C (SC-7792)	Lamina A/C	Monoclonal ratinho	Santa Cruz
9E10	c-myc	Monoclonal ratinho	Roche
ab290	GFP	Policlonal coelho	AbCam
V5	V5	Monoclonal ratinho	Invitrogen
GNS-1	Ciclina B	Monoclonal ratinho	Pharmigen

Tabela 2.6 – Anticorpos primários utilizados.

Número do anticorpo	Conjugado com	Anti IgG de	Gerado em	Companhia
A-21049	Alexa 350	Ratinho	cabra	Molecular probes
A-11008	Alexa 488	Coelho	cabra	Molecular probes
A-11001	Alexa 488	Ratinho	cabra	Molecular probes
A-11006	Alexa 488	Ratazana	cabra	Molecular probes
A-11012	Alexa 594	Coelho	cabra	Molecular probes
A-11005	Alexa 594	Ratinho	cabra	Molecular probes
A-11007	Alexa 594	Ratazana	cabra	Molecular probes
111-035-144	HRP	Coelho	Cabra	Jackson ImmunnoReasearsh
115-035-146	HRP	Ratinho	Cabra	Jackson ImmunnoReasearsh

Tabela 2.7– Anticorpos secundários utilizados.

2.2 Técnicas variadas

As técnicas vulgares de biologia molecular utilizadas na realização deste trabalho foram, a menos que se descreva em contrário, segundo os protocolos de Sambrook & Russel, 2001. Assim, os protocolos para a preparação de células competentes, o congelamento de estirpes bacterianas, a transformação bacteriana, a preparação e

purificação de DNA plasmídico, restrição de DNA e ligação do DNA a plasmídeos, encontram-se todos descritos no manual referido.

Após a confirmação, por análise de restrição, da identidade do clone desejado, o DNA plasmídico foi produzido e purificado em grande escala utilizando o Kit da Quiagen. O DNA obtido por este método foi utilizado para as transfecções de células de mamíferos.

As reacções de sequenciação realizaram-se utilizando o Kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. As reacções de sequenciação foram executadas da seguinte forma: 96°C durante 4 minutos, seguido de 25 ciclos a 96°C durante 10 segundos, 50°C durante 5 segundos e 60°C durante 4 segundos. As amostras foram aplicadas num sequenciador 377 DNA sequencer (ABI PRISM).

2.2.1 Preparação de RNA

Preparou-se RNA de células HeLa utilizando o kit RNAqueous™-4PCR da Ambion. Extraíu-se o RNA de 2×10^6 células que estavam em crescimento exponencial. O RNA obtido foi ainda sujeito a um tratamento com DNase, como indicado no Kit. Quantificou-se o RNA por espectrofotometria, e a qualidade do mesmo foi verificada por análise em gel de agarose corado com Brometo de Etídio.

2.2.2 PCR

As reacções de PCR foram realizadas utilizando 25-50 ng de DNA, 10 µM de primer, 1X tampão de PCR (10 mM Tris-HCl pH 9,2, 1,5 mM de $MgCl_2$ e 75 mM de KCl), 0,2mM dNTPs mix (Invitrogen), e 10 unidades de Taq Polimerase. As reacções foram realizadas num volume total de 25 µl.

Geralmente, a reacção de PCR tinha um primeiro ciclo de desnaturação durante 5 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 56°C por 40 segundos e a 72°C durante 60 segundos. Após estes trinta ciclos seguia-se ainda um ciclo de extensão 10 minutos a 72°C. No caso de se obterem amplificações inespecíficas, aumentou-se a temperatura de hibridação dos primers para 58°C.

Para a amplificação de cDNA a partir do RNA obtido em HeLa a temperatura de hibridação dos primers foi de 58°C.

2.2.3 RT- PCR

A preparação de DNA a partir de RNA de HeLa foi realizada utilizando o kit da Ambion RETROscript™. O DNA foi obtido através de duas reacções sequenciais de PCR (RETROscript Protocol, Two-Step RT-PCR). Na primeira reacção obteve-se a cadeia de cDNA complementar ao RNA. Para a obtenção do cDNA em cadeia dupla, realizou-se um PCR ao cDNA obtido na primeira reacção. Os primers para a obtenção da primeira cadeia

de cDNA foram os Random decamers fornecidos pelo kit. Realizaram-se os controlos às experiências indicados pelo fabricante.

Para a obtenção de DNA codificante para hsMob1, hsMob2, hsMob3A, hsMob3B, hsMob3C, hsMob4A e hsMob4B a partir do RNA de HeLa utilizaram-se, respectivamente, os seguintes pares de primers: InCF7/InCF1, InCF3/InCF4, InCF11/InCF12, InCF13/InCF14, InCF15/InCF16, InCF9/InCF10, InCF17/InCF18.

2.2.4 Géis de proteínas e Western Blots

2.2.4.1 Géis de proteínas (SDS-PAGE)

As células foram lavadas duas vezes com tampão de desagregação (50 mM tris-HCl, 140 mM de NaCl, 10 mM EDTA e 10 mM β -mercaptoetanol), tendo sido seguidamente incubadas neste mesmo tampão durante 10 minutos. A perda de aderência das células foi controlada por microscopia. Centrifugaram-se as células a 1500g durante 5 minutos a 4°C e lavaram-se duas vezes com PBS (a 4°C). As amostras foram imediatamente congeladas. Antes da sua aplicação num gel de poliacrilamida, estas foram ressuspensas em tampão Lamli 2 vezes concentrado (100 mM trisHCl pH8, 4% SDS, 0,2% de azul de bromofenol, 20% glicerol, 200 mM β -mercaptoetanol) e fervidas.

Os géis de proteínas foram preparados de uma forma semelhante ao descrito em Sambrook & Russel, 2001. Utilizou-se uma solução de 30% de acrilamida/Bis acrilamida (BioRad). Os géis foram corridos no sistema Mini-PROTEAN II (Bio-Rad), em tampão de corrida 1X (25 mM Tris, 0,192 M glicina, 0,1% de SDS, pH8,3). Aplicou-se uma corrente eléctrica de 15 mA enquanto as amostras se encontravam no gel de concentração; ao atingirem o gel de separação aplicou-se uma corrente eléctrica de 30 mA. Utilizou-se como marcador de pesos moleculares o Kaleidoscópio (BioRad), sendo aplicado juntamente com as amostras. Os géis de proteínas foram, ou corados com azul de Coomassie durante 4h (0,25% azul brilhante de Coomassie (Bio Rad), 45% Metanol e 10 % de Acido Acético Glacial), seguidos de descoloração (45%Metanol, 10% de ácido acético Glacial), ou transferidos (por electroforese) para membranas de PVDF, para subsequente realização de Western blot.

2.2.4.2 Western Blots

Submergiu-se a membrana de PVDF em Metanol durante 1 minuto. Seguidamente com água destilada 5 minutos, e por último, esta foi equilibrada em tampão de transferência (25 mM Tris-HCl, 192 mM de Glicina, 20% de Metanol, pH entre 8 e 8,3) durante um tempo mínimo de 10 minutos. Simultaneamente, incubou-se o gel em tampão de transferência durante 10-20 minutos. O gel e a membrana foram colocados numa cassete, no meio de duas folhas de papel Whatman 3MM, seguidos de duas esponjas. As proteínas foram

transferidas durante 1 hora a 300 mA em tampão de transferência. Após a transferência, bloquearam-se as membranas (PBS, 0,1% Tween20, 10% de leite magro) durante uma hora. Seguiu-se uma lavagem rápida (PBS, 0,1% Tween20, 1% de leite magro) e incubação do anticorpo primário durante uma hora à temperatura ambiente. Os anticorpos foram todos incubados em PBS, 0,1% Tween20, 1% de leite magro, pH7.5 - 8. Lavou-se a membrana 3 vezes por 10 minutos com PBS, 0,1% Tween20, 1% de leite magro, e incubaram-se os anticorpos secundários durante 1 hora à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas como indicado anteriormente, e seguiu-se ainda uma lavagem de 10 minutos em PBS. O sinal foi detectado utilizando um Kit da Pierce (SuperSignal) seguindo as instruções do fabricante. Utilizou-se filme Hyperfilm ECL (Amersham) para a exposição. A revelação deste filme foi feita utilizando o revelador Kodak.

Utilizaram-se os anticorpos primários anti-Xmob1, purificado por afinidade (1/1000), anti Lamina A/C (1/100), anti-ciclina B (1/1000), anti-V5 (1/5000) e anti γ -tubulina GTU 88 (1/1000).

Utilizaram-se como anticorpos secundários anticorpos anti-IgG de coelho (1/10000) ou anti IgG de ratinho (1/6000), conjugados com HRP-peroxidase (consoante o anticorpo primário utilizado).

2.2.5 Expressão heteróloga de proteínas em *E.coli*

Para expressão de proteína heteróloga em bactérias, transformaram-se células BL12 com o plasmídeo contendo o gene de interesse (pet22b ou pGEX4T, tabela 2.3). De uma cultura de bactérias crescida durante a noite, fez-se uma diluição de 1/100, e incubou-se novamente a 37°C com agitação. Quando a DO_{600} da cultura era de 0.4, adicionou-se IPTG para uma concentração final de 0,5 mM, e a produção da proteína de interesse foi realizada incubando uma vez mais as bactérias a 37°C durante 4h. Findo este tempo, centrifugaram-se as bactérias (5 minutos a 3000g), lavaram-se com PBS e, ou se congelaram as amostras (para análise futura), ou foram ressuspensas em tampão Lamlli, fervidas, e analisadas num gel de SDS-PAGE. Como controlo, utilizou-se uma cultura crescida nas mesmas condições, mas à qual não se adicionou IPTG e, que por isso, não deveria expressar a proteína de interesse.

2.2.6. Imunopurificação de Anticorpos

A Imunopurificação de anticorpos teve como objectivo confirmar especificidade do anticorpo anti-Xmob1 em reconhecer as proteínas hsMob4, e ainda confirmar a expressão de hsMob4 em HeLa.

Na purificação do anticorpo utilizou-se a proteína hsMob4A imobilizada numa membrana de PVDF. Juntaram-se os fragmentos de membrana que continham a hsMob4A,

cortaram-se e colocaram-se num eppendorf. Seguidamente, bloquearam-se as membranas (PBS-Tween20 1%-BSA10%), lavaram-se brevemente (PBS-Tween20 1%) e incubaram-se com 500 µl de soro total anti-Xmob1 diluído em 1000 µl de PBS (volume final de 1,5 ml) durante três horas. Recolheu-se o soro imunodeplectado e lavaram-se as membranas durante 10 minutos com PBS-tween20 -0,1%, repetindo-se as lavagens três vezes. Eluíram-se os anticorpos com 200 µl de citrato de sódio 50 mM a pH2,8, durante 5 minutos, e seguidamente estes foram neutralizados com a adição de 20 µl de Tris-HCl 1M a pH 8,8. Realizaram-se três eluições de anticorpos por cada imunodeplecção. Ao soro imunodeplectado, retirou-se uma alíquota de 350 µl e o restante foi incubado com outros fragmentos de membrana que continha hsMob4A. Repetiu-se o processo de imunodeplecção da mesma fracção de soro três vezes.

O sucesso da imunodeplecção e da imunopurificação foi confirmado em Western Blot, num extracto proteico de bactérias a expressar hsMob4A. Seguidamente, testaram-se os soros imunopurificados e imunodeplectados num extracto de células HeLa.

O soro imunopurificado, utilizado nos estudos (RNAi e Westerns Blots), em que se analisou a produção de proteína endógena ou heteróloga, foi gentilmente cedido e purificado por Didier Fesquet.

2.3. Manipulação de células de mamíferos

2.3.1 Sincronização de células

Sincronizaram-se as células HeLa em prometáfase, por incubação com 60 ng/µl de nocodazole durante 10 h. Para remoção do bloqueio, as células foram lavadas três vezes como meio de cultura normal. Seguidamente as células foram recolhidas, ou semeadas em placas para subsequente recolha em diferentes tempos após a libertação do bloqueio.

Sincronizaram-se as células HeLa em G1/S após um duplo bloqueio com timidina 2,5mM. As células foram incubadas com timidina durante 24 horas, lavadas três vezes e incubadas em meio de cultura sem timidina durante 12 horas; após este tempo, repetiu-se o bloqueio. Iniciaram-se as experiências de microscopia em tempo real (filmes) oito horas após a libertação do segundo bloqueio.

2.3.2 Ensaios de renucleação de microtúbulos

Os ensaios de renucleação dos microtúbulos foram realizados em células HeLa transfectadas com plasmídeos, que expressavam hsMob4A (dCF48) e hsMob4B (dCF47)³ (como controlos utilizaram-se células não transfectadas e células transfectadas com vector sem a região codificante dos genes referidos). Utilizaram-se placas de 12 alvéolos, a

³ hsMob4A e hsMob4B estavam clonados em pCDNA3.1

transfecção foi realizada como descrito na secção 2.3.3, e as células foram fixas dois dias depois da transfecção.

Para a despolimerização dos microtúbulos, utilizaram-se duas estratégias diferentes: incubaram-se as células 30 minutos no gelo, ou adicionou-se ao meio de cultura nocodazole (Sigma) para uma concentração final de 5 μ M e incubaram-se as células 40 minutos no gelo. Após este tratamento, fixou-se imediatamente um conjunto de lamelas transfectadas com dCF48, dCF47, pcDNA3.1, e células não transfectadas. Para os diferentes tratamentos de renucleação de microtúbulos, utilizaram-se sempre estes quatro conjuntos de amostras.

Permitiu-se a repolimerização dos microtúbulos, lavando-se as células rapidamente (três vezes) com meio de cultura (previamente aquecido a 37°C) e incubando-as a 37°C durante 1 minuto e 30 segundos ou durante 5 minutos. Findo este tempo, fixaram-se as amostras com Metanol/Acetona, seguindo-se uma imunofluorescência na qual se imunolocalizaram os microtúbulos com β -tubulina (Sigma).

2.3.3 Transfecções de DNA plasmídico

As transfecções de DNA plasmídico em células de mamíferos, foram realizadas utilizando o reagente de transfecção LipofectAMINE(tm)2000 (Invitrogene). Para as transfecções realizadas em placas de 24, 12 e 6 alvéolos, semearam-se de véspera $0,3 \times 10^5$, $0,4 \times 10^5$ e $2,5 \times 10^5$ células, utilizou-se 0,5 μ l, 1 μ l e 2 μ l de reagente de transfecção e 0,8 μ g, 1 μ g e 2 μ g de DNA respectivamente. O restante procedimento da transfecção foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Três horas após a transfecção, lavaram-se as células e substituiu-se o meio de cultura. A eficiência de transfecção foi geralmente de 80-90%. Para co-transfecções, a quantidade de DNA total utilizada é a mesma que a utilizada nas transfecções simples (0,8 μ g, 1 μ g e 2 μ g).

Para as co-transfecções de DNA plasmídico realizadas nas caixas pretas⁴ utilizámos condições ligeiramente diferentes. Semearam-se 2×10^5 células, e estas foram sujeitas a um duplo bloqueio com timidina e transfectadas 5 horas após a libertação do primeiro bloqueio com timidina com 2 μ g de DNA total. Destes 2 μ g, 0,5 μ g eram do vector marcador da transfecção (neste caso pEYFPtub) e 1,5 μ g eram do vector que expressava a proteína de interesse: dCF48 e dCF47, ou apenas pcDNA3.1 (como controlo da experiência). Para a transfecção, utilizou-se 1,5 μ l Lipofectamina 2000, sendo o restante procedimento efectuado

⁴ As caixas pretas, são as placas de cultura onde se semearam as células para a análise de microscopia de tempo real. Estas têm uma dimensão próxima de um poço de uma placa de 6 alvéolos.

de acordo com as instruções do fabricante para transfecções de placas com 6 alvéolos. O meio de cultura foi substituído por meio novo três horas após a transfecção.

Iniciou-se a realização dos filmes (microscopia de tempo real) 8 horas após a libertação do segundo bloqueio.

2.3.4 Análise de viabilidade celular após a sobreexpressão de hsMob4

Para a análise da viabilidade celular após a sobreexpressão de hsMob4, lavaram-se as células três vezes com PBS (a 37°C), e adicionou-se novo meio de cultura. Seguidamente contou-se o número de células fluorescentes em quatro zonas previamente delimitadas da placa de cultura (estas definiram-se antes do início da experiência, por marcação da placa de cultura de células). Este processo foi repetido durante 6 dias, sempre à mesma hora. O objectivo das lavagens foi remover as células mortas em suspensão, de forma a obter contagens correctas da viabilidade celular.

De forma a garantir que as células removidas nas lavagens estavam mortas ou a morrer, cultivaram-se de novo em meio de cultura. Durante os 6 dias da experiência analisou-se também a cultura resultante destas células.

2.4 A técnica de RNAi

Os Oligos de siRNA foram encomendados à Dharmacon. Recebeu-se o oligo correspondente à cadeia de mRNA e oligo cadeia complementar. O emparelhamento dos oligos, para formar o duplex de siRNA, foi realizado no laboratório.

2.4.1 Emparelhamento dos oligos

Juntou-se 30 µl de cada oligo (que estavam a uma concentração de 50 µM) com 15 µl de tampão de emparelhamento (100mM de Acetato de Potássio, 30 mM de Hepes-KOH pH 7,4 e 2 mM de Acetato de Magnésio) e incubou-se a 90°C durante 1 minuto. Seguidamente, centrifugou-se brevemente a solução (15 segundos) e incubou-se durante 1 hora a 37°C. Os oligos foram então utilizados imediatamente para transfecção, ou congelados (a -20°C) para subseqüentes transfecções. O duplex de siRNA foi descongelado no máximo 5 vezes.

A confirmação do sucesso do emparelhamento dos oligos foi feita por visualização num gel de poliacrilamida. Todo o material foi tratado de acordo com as indicações existentes no Sambrook & Russel (2001) referentes ao tratamento de amostras de RNA. Fez-se um gel de poliacrilamida a 20%, que foi corrido no sistema da Bio Rad MiniProteanII,

em tampão TBE (90 mM de tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8), aplicando-se uma diferença de potencial de 80 V. Permitiu-se a migração da amostras até que se observasse o azul de Bromofenol a 1 cm de distância do final do gel. Após a corrida, corou-se o gel numa solução de TBE com brometo de Etídio a uma concentração de 0,5 µg/ml durante 30 minutos, para subsequente observação após exposição à luz ultra violeta.

Para a visualização do emparelhamento dos oligos, aplicaram-se amostras do duplex de siRNA e de cada um dos oligos antes de estarem em duplex. A diferença de migração entre os oligos em cadeia simples e o duplex (oligo em cadeia dupla), permitiu confirmar o sucesso do emparelhamento destes.

2.4.2 Transfecção do duplex de siRNA

Antes de iniciar a transfecção, definiu-se a quantidade de células com que se iria realizar a experiência. Foi bastante importante definir este parâmetro, pois os resultados obtidos sugeriam que a depleção de hsMob4(A&B) causaria problemas na citocinese. Para analisar bem esse fenótipo, era muito importante que as células não estivessem próximas da confluência, visto que isso dificultaria a visualização dos midbodies e eventuais ligações entre as células. Semearam-se então diferentes quantidades de células nas placas de 24 alvéolos e analisou a confluência destas após 4 dias. Concluiu-se que a confluência ideal das células nas placas no momento da transfecção seria de aproximadamente 40%. No entanto, os fabricantes do reagente de transfecção indicam que esta é muito mais eficiente se as células estiverem a 80-90% de confluência. Desta forma, iniciar a experiência com 40% de confluência poderia originar uma transfecção com baixos níveis de eficiência. Optimizaram-se portanto as condições de transfecção.

A optimização das condições de transfecção foi realizada transfectando as células com diferentes quantidades de reagente de transfecção (1,5 µl, 3 µl, 4 µl e 6 µl), e mantendo constante o mesmo número de células e a concentração de oligo. Utilizou-se um oligo fluorescente (conjugado com FITC) e, um dia após a transfecção contaram-se aproximadamente 400 células por poço de forma a analisar a eficiência de transfecção. Fez-se a razão entre o número de células fluorescentes e todas as células contadas, concluindo-se que a maior eficiência de transfecção (aproximadamente 90%) se obteve-se quando se utilizou 6 µl do reagente de transfecção (Oligofectamina, Invitrogen).

No dia anterior à transfecção, foram semeadas $0,25-0,3 \times 10^5$ células por poço numa placa de 24 alvéolos. Antes de se iniciar a transfecção, substituiu-se o meio de cultura por 500 µl de meio novo sem soro. Por cada poço que se queria transfectar, juntou-se 60 pmol

do duplex de siRNA (3 μ l do duplex que está a uma concentração de 20 μ M) com 50 μ l de meio MEM (GIBCO). Num outro tubo, adicionou-se 24 μ l de MEM com 6 μ l de oligofetamina, agitou-se suavemente esta mistura, e incubou-se à temperatura ambiente durante 25 minutos. Seguidamente, juntaram-se os conteúdos dos dois tubos, agitou-se suavemente, e adicionou-se MEM para perfazer um volume final de 100 μ l. A mistura de transfecção foi então adicionada às células. Findas 5 horas do início da transfecção, substituiu-se o meio por meio novo completo (DMEM com 10% de SFB). Dois dias após o início da transfecção, as células foram recolhidas para análise fenotípica (imunofluorescência) ou para análise da eficiência da depleção (Western Blot). Utilizou-se como concentração final de oligo na experiência 20 nM, sendo que para as transfecções duplas se utilizaram quantidades iguais de cada duplex (a concentração final não excedia o valor indicado acima).

Para a microscopia de tempo real, que como já foi referido se realizava nas caixas pretas, também teve que se otimizar o processo de transfecção. O método de optimização de transfecção foi semelhante ao descrito acima. Inicialmente definiu-se o número de células com as quais se iniciava a experiência, fixou-se esse valor e a concentração de oligos a utilizar, e variou-se a quantidade de reagente de transfecção. Numa das condições utilizadas obteve-se uma eficiência de transfecção de 90%, tendo sido essa a escolhida para prosseguir os estudos. Essa condições são: 2×10^5 células, 8 μ l de reagente de transfecção, e 10 μ l de duplex (com a concentração de 20 μ M). Semearam-se 2×10^5 células Hela-centrina; no dia seguinte iniciou-se o duplo bloqueio com timidina e, no intervalo dos dois bloqueios, 5 horas após a libertação do primeiro bloqueio, as células foram transfectadas. Para a transfecção utilizou-se 10 μ l de oligos (à concentração de 20 μ M) diluídos em 17,5 μ l de DMEM; simultaneamente diluiu-se 8 μ l de Oligofectamina em 22 μ l de DMEM, e incubaram-se estas duas misturas 5 minutos à temperatura ambiente. Findo este tempo, juntaram-se as duas soluções, incubando-as durante mais 15 minutos, de forma a se obter a solução de transfecção. A solução de transfecção foi adicionada às células, que se encontravam em meio de cultura sem soro. As células foram incubadas a 37°C com a solução de transfecção durante 5-6 horas, tempo após o qual se lavaram as células e se substituiu o meio de cultura por meio completo (com soro fetal bovino).

2. 5 Técnicas citológicas

2.5.1 Imunofluorescência

Para a imunofluorescência, foram semeadas sobre as lamelas $0,7-0,8 \times 10^5$ células HeLa e HeLa-centrina em placas de 24 alvéolos, e $0,5-0,6 \times 10^5$ HeLa e HeLa-centrina em placas de 12 alvéolos. No dia seguinte, antes da fixação, as células foram sujeitas a três lavagens rápidas com tampão PEM (10 mM PIPES, 2 mM $MgCl_2$ e 5 mM de EDTA, pH 6,8) pré-aquecido a 37°C. Utilizaram-se diferentes métodos para fixar as células, que se apresentam de seguida. O fixador foi sempre aplicado após as lavagens com PEM acima descritas.

2.5.1.1 Fixação com Metanol

Às células foi adicionado Metanol a -20°C e procedeu-se à incubação durante 10 minutos a essa temperatura. Seguidamente fizeram-se três lavagens de 5 minutos com tampão PEM.

Após a fixação, as células foram permeabilizadas com 0,5% de TritonX-100 em PEM durante 10 minutos à temperatura ambiente, e seguiram-se três lavagens de 5 minutos com PBS (pH 6,9-7).

Antes da incubação com os anticorpos primários, as células foram lavadas durante 5 minutos numa solução de 0,05% Tween 20 em PBS, sendo os anticorpos primários previamente diluídos em ADB (solução de diluição de anticorpos, 1 % SFB- 0,05% de Tween20 em PBS). Incubaram-se as células com os anticorpos primários durante uma hora à temperatura ambiente, em câmara húmida. As células foram depois lavadas três vezes com PBS e uma vez com PBS-Tween 0,05% durante um total de 20 minutos (5 minutos cada lavagem).

Realizou-se então a incubação dos anticorpos secundários (também diluídos em ADB) durante 30 minutos em câmara húmida e no escuro. A partir deste momento as lamelas foram, tanto quanto possível, protegidas da luz. Após a incubação dos anticorpos secundários, as células foram também lavadas três vezes com PBS e uma vez com PBS-Tween 0,05%, durante um total de 20 minutos.

Seguidamente, incubou-se o corante de DNA durante 15 minutos, após o que se lavaram as lamelas três vezes 5 minutos com PBS. Consoante o ensaio, utilizou-se um de dois corantes de DNA: DAPI (Molecular Probes) ou Iodeto de Propídeo (Molecular Probes). Ambos foram preparados em PBS, sendo a concentração de DAPI de 100 mM e de Iodeto de Propídeo 2 µg/ml. Quando o DNA foi corado com Iodeto de Propídeo, as células foram tratadas com RNase (uma vez que este corante reage com RNA e DNA). Para tal,

adicionou-se RNase à solução de incubação do anticorpo primário a uma concentração final de 40 µg/ml.

Finalmente, fez-se a montagem das lamelas em lâminas de vidro, tendo-se selado a preaparação com verniz transparente (Maybelline). Como meio de montagem utilizou-se Fluorgard (BioRad), Vectashield (Vector) ou ainda Moiwol (CalBiochem).

O Moiwol foi preparado no laboratório diluindo 2,4 g de Moiwol em 6 ml de glicerol, a solução foi misturada por agitação, seguida de adição de 6 ml de água e agitou-se durante a noite. No dia seguinte, juntaram-se 12 ml de tampão Tris pH7,4 (a uma concentração de 0,2M) e aqueceu-se a solução a 50°C mantendo uma agitação suave durante aproximadamente 10 minutos. Após a dissolução do Moiwol, centrifugou-se a solução a 5000 g durante 15 minutos. Finalmente, adicionou-se DABCO (Sigma) para uma concentração final de 2,4%. A solução foi aliquoteada e congelada; uma vez descongelada, guardava-se no frigorífico (a 4°C) durante 4 semanas no máximo.

Nestes ensaios utilizaram-se os seguintes anticorpos primários: soro anti-Mob4 (diluído a 1/100), anti γ -tubulina GTU88 (diluído a 1/100), anti γ -tubulina (coelho, diluído a 1/100), anti-Lamina A/C (diluído a 1/100), anti α -tubulina (rat, diluído a 1/100), anti α -tubulina (ratinho, diluído a 1/100) e anti β -tubulina (diluído a 1/200). Utilizaram-se como anticorpos secundários os anticorpos Alexa (diluídos 1/500).

2.5.1.2 Fixação com Metanol/Acetona

A solução de Metanol/Acetona (50/50) utilizada foi preparada no próprio dia, tendo sido refrigerada a -20°C antes de se iniciar o processo de fixação. Para a fixação, adicionou-se a solução de metanol/acetona às células, e incubou-se durante 2-3 minutos à temperatura ambiente e, de seguida, lavaram-se as células três vezes durante 5 minutos com tampão PEM.

O restante procedimento da imunofluorescência foi realizado de forma semelhante ao descrito para a fixação com metanol.

2.5.1.3 Fixação com Formaldeído ou Paraformaldeído

As fixações com Formaldeído (Calbiochem) ou com Paraformaldeído⁵ (Merck) eram muito semelhantes. Ambos os fixadores estavam à concentração de 3,7%, diluídos em tampão PEM e aquecidos a 37°C antes de serem adicionados às células. Após uma fixação de 10 minutos à temperatura ambiente, as células eram lavadas 3 vezes 5 minutos com

⁵ Preparou-se o paraformaldeído de fresco em PEM pH 6,8, de acordo com as indicações de Spector *et al.* (1998)

tampão PEM. Sendo a imunofluorescência realizada de forma semelhante ao descrito para a fixação com metanol.

2.5.1.4 Fixação com Formaldeído após pré-extracção

Para a fixação com formaldeído, utilizou-se ainda um protocolo de pré-extracção das células antes da fixação. Após a lavagem inicial com PEM, as células foram permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 em PEM durante 1 minuto a 37°C (a solução estava pré-aquecida a essa temperatura). O restante protocolo de fixação e de imunofluorescência foi igual ao indicado para a fixação com formaldeído.

2.5.1.5 Fixação com gluteroaldeído

Para a fixação com gluteroaldeído, as células foram incubadas com uma solução de 0,5% de gluteroaldeído em PEM durante 10 minutos e, seguidamente, as células foram lavadas 3 vezes durante cinco minutos com PEM.

Após a fixação, as células foram permeabilizadas com 0,5% de TritonX-100 em PEM durante 10 minutos à temperatura ambiente e seguiram-se três lavagens de 5 minutos com PBS (pH 6,9-7). Para esta fixação, incubaram-se ainda as células numa solução de NaBH₄ (2,5 mg/ml) em 50% de etanol, durante 30 minutos, nos quais se substituiu a solução durante 3 ou 4 vezes; as células foram seguidamente lavadas como indicado anteriormente para o passo de permeabilização (três lavagens de 5 minutos com PBS a pH 6,9-7), sendo o restante procedimento de imunofluorescência foi semelhante ao indicado para a fixação com metanol.

2.5.2 Microscopia de tempo real

Oito a dez horas após a libertação do segundo bloqueio com timidina iniciaram-se as filmagens das células. Para tal foram incubadas em meio independente de CO₂ sem vermelho de fenol (Gibco). No caso das células HeLa-centrina, o meio era ainda suplementado com 10% de SFB. Para evitar a evaporação do meio de cultura, aplicou-se uma camada de óleo mineral (Sigma) sobre o meio de cultura. Todas as soluções estavam previamente aquecidas a 37°C, e manteve-se esta temperatura durante a experiência. Para a microscopia de fluorescência, foi utilizado um conjunto de filtros (croma technology), uma camera Penta Max (Princeton Instruments) e uma roda de filtros Lambda10-2 (Shuter), controlados por um computador Power Wave (Power Computing) com o software IpLab. No caso da sobreexpressão de hsMob4A e hsMob4B, fez-se a aquisição de imagens de microscopia de tempo real durante 6-8 horas. Para as análises RNAi, a aquisição de imagens foi realizada durante 22-23 horas. Tiram-se fotografias com intervalos de três minutos.

Resultados

3. A família das proteínas tipo Mob

Os genes Mob de *S. cerevisiae* foram clonados e caracterizados em 1998 (Luca & Winey, 1998). Estes investigadores verificaram que células de levedura mutantes para o gene *MOB1* eram incapazes de completar a citocinese. Estas células mutantes param o ciclo celular em anafase tardia com o fuso mitótico alongado, com a cromatina segregada correctamente, e com níveis elevados de ciclina B. Os mesmos investigadores mostraram mais tarde que a proteína scMob1 se localiza no corpo polar do fuso (SPB) durante a anafase e a telofase (Luca *et al.*, 2001). Em telofase, para além da localização no SPB, a scMob1 localiza-se ainda no pescoço da gémula. A acumulação da proteína scMob1 no pescoço da gémula mesmo antes de citocinese estará de acordo com uma possível função citocínética para esta proteína, como visto no fenótipo do mutante (Luca *et al.*, 2001). Apesar a scMob1 executar uma função na saída de mitose e em citocinese, ainda não se sabe como é que scMob1 actua de forma a conseguir a finalização destes processos celulares.

Em eucariotas superiores o controlo da citocinese é ainda um terreno desconhecido, não se sabendo com exactidão quais os eventos necessários à separação final das duas células filhas após a mitose.

Este trabalho iniciou-se com uma busca de genes codificantes para proteínas tipo Mob em células humanas. A pesquisa na base de dados foi realizada utilizando as sequências disponíveis no GenBank. O GenBank é a base de dados de sequências genéticas do NIH, possuindo uma colecção de todas as sequências de DNA disponíveis para o público. Utilizou-se a base de dados de ESTs humanos (dbEST) do GenBank, para a realização da pesquisa. Um EST (do Inglês Expressed Sequences Tag) é uma sequência parcial de um cDNA.

A pesquisa na base de dados do genoma humano permitiu-nos identificar vários genes codificantes para proteínas com elevada homologia com a scMob1. Verifica-se que existem, pelo menos, quatro proteínas diferentes tipo Mob em células humanas. As proteínas hsMob1 e hsMob2 codificadas por apenas um gene cada, as proteínas hsMob3 (três isoformas codificadas por três genes distintos) e as proteínas hsMob4 (codificadas por dois genes distintos). Isolaram-se e sequenciaram-se os cDNAs correspondentes aos sete genes tipo Mob humanos. Estas sequências de cDNA dos genes tipo Mob humanos, e que se apresentam neste capítulo, foram por nós depositadas no GenBank, e têm os seguintes números de acesso: AJ580638 (hsMob1), AJ580639 (hsMob2), AJ580635 (hsMob3A), AJ580636 (hsMob3B), AJ580637 (hsMob3C), AJ577473 (hsMob4A), AJ577474 (hsMob4B).

Com a finalidade de determinar o grau de conservação destes genes, realizou-se ainda uma análise nas bases de dados ESTs de outros organismos. Esta pesquisa permitiu concluir que as Mob1 devem ser ubíquas, pois encontram-se potenciais genes equivalentes em muitos outros organismos, incluindo plantas, fungos, algas e insectos.

3.1 As proteínas tipo Mob1

Encontraram-se ESTs codificantes para proteínas tipo Mob1 em todo o reino eucariótico: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis* e *Xenopus tropicalis*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *C. elegans* e nas plantas *Saccharum officinarum*, *Oryza sativa*, *Medicago truncatula*, *Vitis vinifera*, *Gossypium arboreum*, *Solanum tuberosum*, *Fusarium graminearum*, *Lycopersicon esculentum*. Na figura 3.1 apresenta-se um alinhamento entre algumas proteínas tipo Mob1 de diferentes organismos.

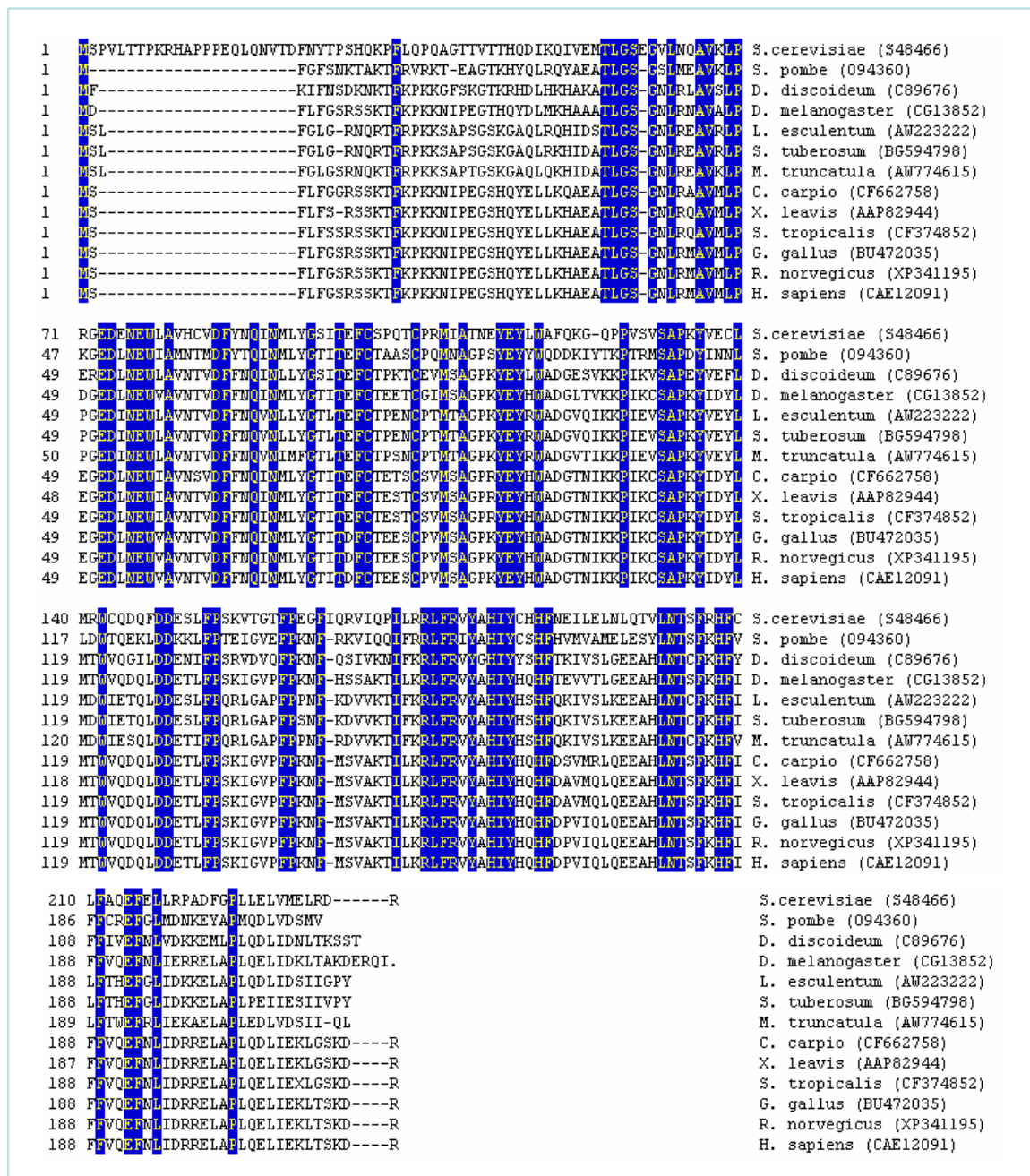


Figura 3.1 – Alinhamento de proteínas tipo *hsMob4* de diversos organismos. A azul estão indicados os resíduos conservados entre todas.

O elevado grau de conservação que se observa para as proteínas tipo Mob entre espécies tão distintas como o Homem e a levedura da cerveja (43% de homologia), assim como a existência de proteínas tipo Mob dispersas por todo o reino eucariótico, sugerem funções importantes e possivelmente conservadas para estas proteínas.

Interessantemente, organismos mais complexos parecem possuir mais genes tipo Mob1. Enquanto que em levedura há dois genes tipo Mob, já em *Drosophila* por exemplo, se encontram quatro proteínas tipo Mob1, e em humanos se encontram sete proteínas tipo Mob1. Na figura 3.2 apresenta-se a árvore filogenética da família das proteínas Mob, obtida por “Neighbour-Joining” utilizando o modelo de matrizes de Dayoff PAM.



Figura 3.2 - Árvore filogenética das distâncias relativas entre as diferentes proteínas tipo Mob de *Homo sapiens* (hs), *Sacharomices cerevisiae* (sc), *Schisosacaramices pombe* (sp) e *Drosophila melanagaster* (D). Podemos observar a existência de 4 ramos da família das proteínas tipo Mob em eucariotas superiores. O tamanho das linhas indica grau de semelhança entre as sequências, e os valores indicados correspondem à distância genética existente entre os diferentes ramos da árvore.

scMob 2	spMob 1	spMob 2	Dmob 1	Dmob 2	Dmob 3	Dmob 4	hsMob 1	hsMob 2	hsMob 3A	hsMob 4A	
27,1	40,5	25,8	17,0	28,8	33,6	43,6	16,4	28,0	33,2	43,1	scMob 1
	34,8	48,8	13,9	21,6	28,6	34,1	13,8	26,2	30,9	34,7	scMob 2
		31,4	17,1	31,9	38,1	53,3	17,1	34,3	41,9	53,8	spMob 1
			13,9	29,9	27,3	35,9	13,3	31,6	30,4	37,5	spMob 2
				13,5	14,1	15,0	79,4	13,9	12,4	15,3	Dmob 1
					27,7	33,2	13,3	39,5	30,9	32,9	Dmob 2
						49,1	15,0	27,3	64,5	48,6	Dmob 3
							15,0	36,4	47,0	88,0	Dmob 4
								15,1	12,9	16,2	hsMob 1
									30,0	36,6	hsMob 2
										50,0	hsMob3 A

Tabela 3.1 – Percentagem de identidade existente entre as diferentes proteínas tipo Mob de *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Drosophila melanogaster* e *Homo sapiens*.

3.2 As proteínas tipo Mob1 humanas (hsMobs)

No genoma humano encontrámos setes genes distintos codificantes para proteínas tipo Mob1. Estes foram agrupados em quatro subfamílias e numerados de acordo com a ordem da sua descoberta.

3.2.1 A proteína hsMob1

O gene hsMob1 codifica para uma proteína, que é a mais divergente da Mob1 de levedura de todas as proteínas tipo Mob em humanos: apenas 16,4% idêntica à scMob1. Pela base de dados, verificou-se que o gene hsMob1 se localiza no cromossoma 2, na região genómica 2q19. O gene foi mapeado por uma homologia de 100% entre o cDNA e o genoma. Todas as localizações genómicas que serão descritas neste capítulo apresentavam esse mesmo grau de homologia. A comparação das sequências do cDNA e da região genómica indicam que o gene hsMob1 possui sete exões e seis intrões (figura 3.3).

Nesta pesquisa encontrou-se ainda um possível pseudogene do hsMob1, localizado no cromossoma 11 na região 11q13. Este deverá ser um pseudogene, pois apesar de possuir 83 a 91% de homologia com a região codificante do hsMob1, encontram-se dois codões STOP em fase com a região codificante do primeiro exão e um codão STOP em fase com a região codificante do segundo exão. É também relevante o facto de não se terem encontrado ESTs codificantes para o referido pseudogene.

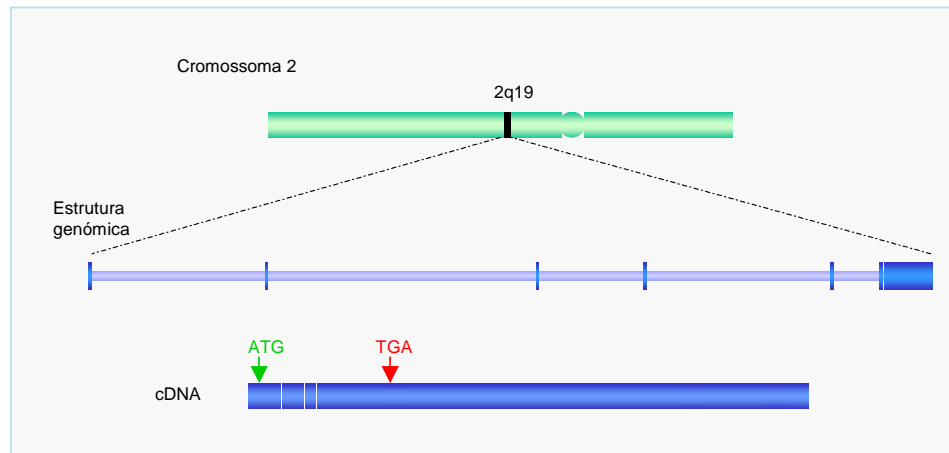


Figura 3.3 – Mapa genômico de *hsMob1*. Localização citogenética e estrutura do gene. A azul escuro estão representados os intrões e a azul claro os exões.

```

ACATCCGGGTACCGACTCCAGCCCGCCTAGACGCTGGCACTATGATCATGGCGGAGGGGACGGCAGTGTGAGGCGGAACAGGCCGGGCA 90
                                     M V M A E G T A V L R R N R P G
CCAAGGCGCAGGATTTCATAAATTGGCCTGATGAATCCTTTGATGAAATGGACAGTACACTAGCTGTTCAACAGTATATTCAACAGAACA 180
T K A Q D F Y N W P D E S F D E M D S T L A V Q Q Y I Q Q N
TAAGAGCAGATTGCTCCAAATATTGACAAAATCTTGAACCACCTGAAGGCCAAGATGAAGGTGTGTGGAAGTATGAACATTTAAGGCAGT 270
I R A D C S N I D K I L E P P E G Q D E G V W K Y E H L R Q
TCGTCCCTTGAGCTAAATGGACTTGCTGTCAAACTTCAGGGTGAATGCCATCCAGATACTTGCACCTCAAAATGACAGCACTGAACAATGGA 360
F C L E L N G L A V K L Q G E C H P D T C T Q M T A T E Q W
TTTTTCTTTGTGCAGCTCATAAAACTCCAAAAGAGTGTCTGTCTATAGACTATAGACACACACTTGATGTTGCTGCATGCTCTCTGA 450
I F L C A A H K T P K E C P A I D Y T R H T L D G A A C L L
ATAGCAATAAATATTTTCCAGCAGGGTTAGCATAAAGGAATCATCTGTAGCGAACTAGGATCAGTATGCCGTAGGATTTACAGAAATAT 540
N S N K Y F P S R V S I K E S S V A K L G S V C R R I Y R I
TTTCACATGCTTATTCATCATCAGGAGATATTTGATGAATATGAAATGAAACATTTTGTGTATCGGTTTACTAAGTTTGTGATGA 630
F S H A Y S H H R Q I F D E Y E N E T F L C H R F T K F V M
AATACAATTTGATGTCCAAAGGATAACCTGATTGTACCAATTTTGAAGAGGAAGTACAGAATTCAGTTTCTGGGGAAGTGAAGCATGAA 720
K Y N L M S K D N L I V P I L E E E V Q N S V S G E S E A .
GGGAATCATAGGAAAAATGTACTGATCATATAATTAACATTAATGTACTGTATATATCATTTTACACATCAATCATGTATCATATATAT 810
AGCTTCTTTTGTATAGTATAGGTTTGTATGCTGGGTTTGCCTTTAAATGGGAAATACCTTTTAAAGTTATTCATAAGCTGTATATATCA 900
CCAGTGTGGCACTCATGGTTTAAATAAGATTAGTATTATCTGTTTATAATGCCTGTTAATAAAGAAATTTACAGTTTGGTAAATATGC 990
TGCTAAACAAATCATTTGGATCACAATCCATCATCAGACAAAACCATCTGTAAAAAATGAGGGAGAGCTTGAGGTTTACACAAGCCATTT 1080
ACTAAGAGGAGTAGAAATGTTTCTATTGGTTTACCTTGAGTTTATGATATCCATAAAAAATTCGTAGTACGTAGTTTGTCTTACCTGTT 1170
AACTTTCCCAATTTGAGATAAAAGTGTTTTAAATTCGTATTATAGTTTGTATATGATATATATAATTAATGTATATCTAAATACAAAT 1260
GCAATGAAGCATTAGTAATACTTAAATAATTTTACTGTGCTACATAAAGTATAACATACTTGGAAAGGATTTACCGTTCTGCAACAACG 1350
GACTGGTACATACAGGATGATCACAATGGTAAGGCACATAAAATTTTCCCACCTGGAAACCTGCCCTGTCCACCCCTCTCATTTCCCT 1440
TAACCTATCTTCAAACTACTTTAGCTGAGAAGCTTTTCCAGAGCTGAGTTAGTGGTGGCTTATACCTATTAGATTGTATTAAATGCT 1530
TACAGATTATACCTCATATTAGCAATTACATTACACTACAAGAAATGTATTGTCATAGGCTCTTGTCTATCTTGTGTTTGGCAAAATGT 1620
TCTACTTAGAAAAACAGTCTTAAATAAGTTTACTCTCTGTTAGTAATATATTAATCTTTCAATTTAAACAGCTAGGCAGCATTAATA 1710
GAATTGAAGAAATACCATAGTATTTATTTTACACCCCTCTCCACGAAGTTTATGTTTGGATTACATGCAGTGTGAGATTATTTGCAA 1800
TAATTCATAGGTTTCAAAGGTTGATGAATAGTCATACATTTTGTGGACTTGTATATAATTCATTGTGGTAAGAAATGATTGAAATGCA 1890
GATTTAAACAATCTTATAATCTATTGAATGCCATTTTGTATAAAGCACGTGGAGGTCTTATGCAAACTGATTGTAATGAGGCAGTAAAGG 1980
TGAAACATTTGATCATGTTGTGAAGAAAGTATTTAAATCAAACTTTTGAACAGATTTAAACAAACATGAGGAACTTTTTTATTGAAGGA 2070
TAATTTTGAAGATGAAATGTATTCATCTTAATTTGTTTTCAAATTTAAGGGAATAATTTATACCATCTTTTCAGACAAGAATGTACAG 2160
CAAAAAATAAGGGGAACAGTAGTACTGAGAGTGTGTGTATGTATAGTGTATGCTTTCCAAGCTTGCCAGTCTTTTGTGCTTTGAACAC 2250
TGCCCATCAGCTACAGTCACTTACTGTTCCCAACCCACAACATCTTTTAAAGAGTCTTAGTTCACAGTGAAAGGAATGATGACTTTTGA 2340
ATTATGGATTATTAATTAATGGCACTATAAACCAATGGTAATGTTTAACTTGTCTAAATATGAGAACTAACTACTAAGTTAA 2430
TAAATTATATATAGCAGTGTAGCTGTTCTCTCTAGATGGTGTCTCACAAATGGATTCCTGTTGCTGACTATTTCTTGTAGTAAATTTAT 2520
ACTAAGGTAGTGACTGAGATTTGGTATCTGGCTGAGTATTTTGAACACATTTTGAATAATATGGCTTAGTGTAAACGGGGACTTAAAT 2610
ATGATTTTTTTTCTTACTCATTTTCACTTCCCTGTACTGTATGTTTGGAAATGATCATAAAAACATCTCCAAAAGAAAAA 2700
AAAA 2704

```

Figura 3.4 - cDNA de *HsMob1*. Encontram-se sublinhados o codão de iniciação (a verde), o codão STOP (a vermelho) e a cauda poli-A (a azul). No retângulo azul destaca-se a sequência removida no possível processamento alternativo.

Encontram-se depositados na base de dados do genoma humano 52 ESTs codificantes para hsMob1, isolados de diversos órgãos/células, como por exemplo linfócitos, cérebro, estômago, fígado, mama, olho, pele, próstata, pulmão e placenta, o que sugere não estar presente apenas em certos tecidos. O cDNA de hsMob1 codifica para uma proteína de 26 kDa. É de notar que nenhum dos cDNAs encontrados possui um codão STOP em fase e antes do ATG inicial. No entanto, o elevado grau de homologias obtidas para as proteínas tipo hsMob1 entre os diferentes organismos sugere que este será o ATG inicial. O gene Mob1 de ratinho foi recentemente, e já no decorrer deste trabalho publicado com o nome de phocein (Bailat *et al.*, 2001) ou de Mob1 (Moreno *et al.* 2001). De notar que a proteína codificada pelo Mob1 de ratinho é exactamente igual à proteína codificada pelo gene hsMob1.

Ao comparar os 52 ESTs reparou-se que a quatro destes falta uma mesma sequência de 63 nucleotídeos. A proteína final, os ESTs caso sejam traduzidos, terá 205 aminoácidos em vez dos 226. Este possível processamento alternativo não parece ser uma especificidade restrita a um tecido, pois estes quatro ESTs foram isolados de tecidos distintos (placenta, cérebro e próstata). Na figura 3.4 apresenta-se o cDNA de hsMob1, bem como a sequência ausente em quatro dos ESTs.

3.2.2 A proteína hsMob2

A proteína hsMob2 tem 28% de identidade com a proteína scMob1 e 26% com a proteína scMob2. A comparação da sequência de cDNA de hsMob2 com a sequência do genoma humano, indica que este mapeia na região 11p15 do cromossoma 2, prevendo para hsMob2 a existência de 4 exões e 3 intrões (figura 3.5).

A previsão da localização genómica de hsMob2 pode ainda estar incompleta, uma vez que não se conseguiu obter um cDNA completo que codificasse para hsMob2 contendo cauda poliA. O cDNA de hsMob2 apresenta-se na figura 3.6.

No GenBank encontram-se em depositados ESTs codificantes para hsMob2 em múltiplos tecidos humanos: cérebro, estômago, fígado e fígado fetal, olhos, pâncreas, pele, próstata, pulmões, rins, intestino, útero e em linfócitos. No nosso trabalho, confirmámos por RT-PCR e sequenciação do respectivo produtos a existência de hsMob2 em células HeLa.

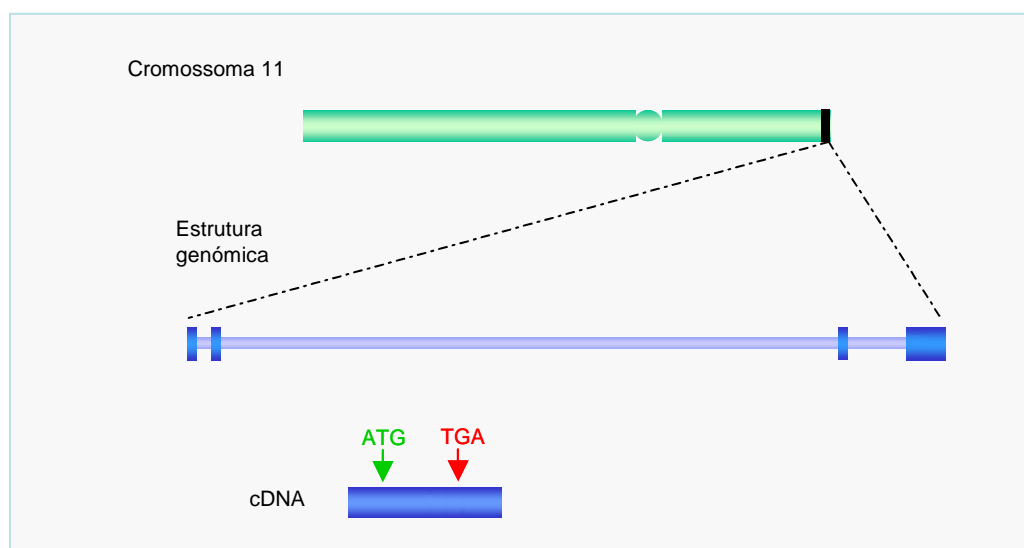


Figura 3.5 – Mapa genômico de *hsMob2*. Localização citogenética e estrutura do gene. A azul escuro estão representados os intrões e a azul claro os exões.

ATGGACTGGCTCATGGGGAAGTCCAAAGCCAAAGCCCAATGGCAAGAAGCCCGCTCGGAGGAGAGGAAGGCCACCTGGAGCCTGAGCAC 90
M D W L M G K S K A K P N G K K P A A E E R K A Y L E P E H
ACCAAGGCCAGGATCACCAGACTTCCAGTTCAAGGAGCTGTTGTTGCTGCCCGCGAGATTGACCTTAAACGAGTGGCTGGCCAGCAACACC 180
T K A R I T D F Q F K E L V V L P R E I D L N E W L A S N T
ACGACGTTTTTCCACCACATCAACCTGTCAGTATAGCAACCATCTCGGAGTTCTGCACAGGAGAGACGTGTGTCAGACGATGGCCGTGTGCAAC 270
T T F F H H H I N L Q Y S T I S E F C T G E T C T M A V C N
ACACAGTACTACTGGTATCAGGAGCGGGGGGAAGGTCAAGTCCAGCGCCCCACAGTACGTTGACTTCGTCTGATGAGCTCCGTGCGAGAAG 360
T Q Y Y W Y D E R G G A K K V K C T A P Q Y V D F V M S S V Q K
CTGGTGCAGGATGAGGACGTGTTCCCCACAAAATACGGCAGAGAAATTCGCCAGCTCCTTTGAGTCCCTGGTGAGGAAGATCTGCGACACAC 450
L V T D E D V F P T K Y G R E F P S S F E S L V R K I C R H
CTGTTCCACGTGCTGGCACACATCTACTGGGCCCACTTCAAGGAGACGCTGGCCCTGGAGCTGCACGGACACTTGAACACGCTCTACGTC 540
L F H V L A H I Y W A H F K E T L A L E L H G H L N T L Y V
CACTTCATCTCTTTGCTCGGGAGTTCAACCTGCTGGACCCCAAAGAGACCGCCATCATGGACGACCTCACCGAGGTGCTATGCGAGCGGG 630
H F I L F A R E F N L L D P K E T A A I M D L C T E V L C S G
GCCCGGGGGTCCACAGTGGGGCAGTGGGGATGGGGCCGGCAGCGGGGCGGGAGGCACARAACCACGTGAAGGAGGATGA 714
A G G V H S G G S G D G A G S G G G P G A O N H V K E R .

Figura 3. 6 - Região codificante de *hsMob2*. A verde está sublinhado o codão de iniciação e a vermelho encontra-se o codão STOP.

3.2.3 A proteína hsMob3

No decurso deste trabalho, isolaram-se e sequenciaram-se os três genes correspondentes às três proteínas tipo hsMob3 humanas: hsMob3A, hsMob3B e hsMob3C. As proteínas tipo hsMob3 são 70 a 80% idênticas entre si (tabela 3.2 e figura 3.7), ao passo que as sequências de DNA da região são entre 65% a 75% idênticas entre si (figura 3.8), e a base de dados do genoma humano indica que são codificadas por três genes distintos. O gene que codifica para a proteína hsMob3A localiza-se no cromossoma 19 na região

genômica 19q12, o da proteína hsMob3B no cromossoma 9 na região genômica 9q21 e o da proteína hsMob3C no cromossoma 1 na região genômica 1q11. A estrutura de cada um dos genes da subfamília hsMob3 apresenta-se na figura 3.9.

hsMob3B	hsMob3C	
80,6%	72,4 %	hsMob3A
	71,8 %	hsMob3B

Tabela 3.2 – Comparação entre as diferentes proteínas tipo hsMob3 humanas. Percentagem de identidade existente entre as diferente proteínas tipo hsMob3.

1	MSNPFLKQVFNKDKTFRPKRKFE	PGTQRFELHKKAAQASLMA	GLDLRLAVQ	HsMob3A
1	MSIA-LKQVFNKDKTFRPKRKFE	PGTQRFELHKKAAQASLNS	GVDLKAAVQ	HsMob3B
1	MALC-LKQVFAKDKTFRPKRKFE	PGTQRFELYKKAQASLKS	GLDLRSVWR	HsMob3c
51	LPPGEDLMDWVAVHVVDFFNRVNL	IYGTISDGCTEQ	SCPVMSGGPKYEYR	HsMob3A
50	LPSGEDQMDWVAVHVVDFFNRINLI	YGTICEFCTERT	CPVMSGGPKYEYR	HsMob3B
50	LPPGENIDDWIAVHVVDFFNRINLI	YGTMAERCSET	SCPVMAGGPRYEYR	HsMob3c
101	WQDEHFRKPTALSAPRYMDLLMDWIE	AQINNEDLFPTN	VCTFPFKNFLQ	HsMob3A
100	WQDLKYKKPTALFAPQVMNLLMDWIE	VQINNEEIFPT	CVGVFPFKNFLQ	HsMob3B
100	WQDERQYRRPAKLSAPRYMALMDWIE	GLINDEEFPT	RVGVFPFKNFLQ	HsMob3c
151	TVRKILSRLFRVFNHVYIHHFDRIA	QMCSEAHVNTCYKH	FYYFVKEFGLI	HsMob3A
150	ICKKILCRLFRVFNHVYIHHFDRV	IVMGAEAHVNTCYKH	FYYFVTEMNLI	HsMob3B
150	VCTKILTRLFRVFNHVYIHHFDS	ILSMGAEAHVNTCYKH	FYYFIREFSLV	HsMob3c
201	DITKELEPLKENTARMCH			HsMob3A
200	DRKELEPLKENTSRMCH			HsMob3B
200	DQRELEPLRENTERIC			HsMob3c

Figura 3.7 – Alinhamento da subfamília de proteínas de hsMob3 (hsMob3A, B e C). A azul indica-se os aminoácidos conservados em todas as sequências.

A estrutura dos genes hsMob3A, B e C é semelhante: possuem todos três intrões e quatro exões, localizando-se no segundo exão a metionina inicial e no quarto exão o codão STOP. Os exões têm todos um tamanho bastante semelhante, sendo o segundo exão o maior. A grande diferença na estrutura destes genes é o tamanho dos intrões: hsMob3A e C têm intrões pequenos e com um tamanho semelhante (entre 300 a 6500 pb), enquanto que os intrões de hsMob3B são significativamente maiores (28417, 73805 e 95895 pb).

Os ESTs que se encontram na base de dados não sugerem uma especificidade tecidual para as proteínas tipo hsMob3, pois encontram-se ESTs codificantes para todas estas proteínas em tecidos bastante variados. Isolaram-se ESTs de hsMob3A na linfa, em células B, no cérebro, no pulmão, nos nervos, no pâncreas no baço; para hsMob3B observou-se que existem ESTs na placenta, coluna cervical, e em tumores (da próstata e teterocarcinoma); e para hsMob3C, os ESTs que se encontraram são provenientes do cérebro, fígado, pulmão, testículos e adipose. A existência simultânea destes mRNAs num

mesmo tipo de célula (HeLa) foi por nós confirmada por RT-PCR e sequenciação dos respectivos produtos. O cDNA e a respectiva tradução de cada uma das sequências de Mob3 humanas apresenta-se na figura 3.10 (para hsMob3b e hsMob3C apresenta-se apenas a região codificante com a respectiva tradução).

1	ATGTCCAACCCCTTCTGAAGCAAGTCTTCAACAAGGACAAGACATTCCGCCCAAGCGCAAGTTTGAGC	HsMob3A
1	ATGTCCA---TAGCCCTGAAGCAGGTATTCAACAAGGACAAGACCTTCCGACCCAAAGAGGAAATTTGAAC	HsMob3B
1	ATGGCC---CTGTGCTGAAGCAGGTGTTGCCAAGGACAAGACGTTCCGGCCGCGGAAGCGCTTTGAGC	HsMob3C
71	CAGGCACCCAGCGCTTCGAGCTGCACAAAGAGGCGAGGCGTGCTGAACGCCGGGCTGGACCTGCGGCT	HsMob3A
68	CTGGCACACAGAGGTTTGAGCTGCACAAACGGCTCAGGCATCCCTCAACTCGGGTGTGGACCTGAAGGC	HsMob3B
68	CGGGCACACAGCGCTTTGAGCTGTACAAAGAGGCGAGGCTCTCTCAAGTCGGGCTTGGACCTGCGCAG	HsMob3C
141	GGCCCTGCAGTTGCCCCGGCGGAGGACCTGAACGACTGGGTGGCTGTTACGTTGGTGGACTTCTTTAAC	HsMob3A
138	GGCTGTGCAGTTGCCAGTGGGAGGACAGAAATGACTGGTGGCAGTACATGTGGTGGACTTCTTTCAAT	HsMob3B
138	TGTGTGAGGCTTACCACCCGGGAGAAACATCGACGACTGGATCGCCGTGCACGTGGTGGACTTCTTTCAAC	HsMob3C
211	CGCTCAACCTCATCTACGGCACCATCAGCGACGGCTGCAAGGAGCAGTCTGCCCCGTATGCGGGG	HsMob3A
208	CGGATCAACCTCATCTATGGCACCATCTGTGAGTTCTGCAAGGAGCGGACCTGTCTCTGTATGTCAGGGG	HsMob3B
208	CGCATCAACCTCATCTACGGCACTATGGCGAGCGCTGCAAGTGAACACAGCTGCCCCGTATGCGGGG	HsMob3C
281	GGCCCAAGTATGAGTACCGCTGGCAGGATGAGCATAAGTTCCGGAAGCCCAAGGCACTCTCCCGCCAG	HsMob3A
278	GGCCCAAGTATGAGTATCGGTGGCAGGATGATCTCAAGTATAAGAAAGCCAAAGCGCTGCCAGCTCCCCA	HsMob3B
278	GGCCCGCTTACGAGTACCGCTGGCAGGACGAGCGCCAGTACCAGCGCCCGCAAGCTCTCTCGCCGCG	HsMob3C
351	GTACATGGACCTGCTGATGGACTGGATCGAGCGGAGATCAACAACGAGGACCTCTTCCCAACCAAGTT	HsMob3A
348	GTACATGAACCTTCTTATGGATTGGATTGAGGTTGAGATCAACAACGAGGAAATATTTCCAAATGCGTG	HsMob3B
348	CTATATGCAATTGCTCATGGACTGGATCGAAGGCTCATCAACGACGAAGAGGTTCTTTCCACGCGTGTT	HsMob3C
421	GGCACTCCGTTTCCCAAGAACTTCTTGACACGGTGCG-GAAGATCCTGTGCGCGGTGTTCCGCGTGTTC	HsMob3A
418	GGTGTTCCTTCCCAAGAACTTCTTGAGATC-TGCAAGAAGATCCTGTGCGCGCTTTTCCGCGTGTTC	HsMob3B
418	GGAGTTCCCTTCCCAAGAACTTCCAGCAGGTC-TGCACCAAGATCCTGACCGCTCTTCCGAGTCTTT	HsMob3C
490	GTGCACGTCTACATCCACCCTTTGACCGCATCGCGCAGATGGGCTCCGAGGCCACGTGAACACCTGCT	HsMob3A
487	GTCCACGTCTATATCCACCCTTCGACCGGCTCATTGTGATGGGTGAGAGGCCCATGTCAACACCTGCT	HsMob3B
487	GTCCATGTCTACATCCACCCTTCGATAGCATCTCAGCATGGGGGAGAGGCCACGTGAACACCTGCT	HsMob3C
560	ACAAACACTTCTACTATTTCTGTCAGGAGTTCGGCTCATCGACACCAAGGAGCTGGAGCCACTGAAGA	HsMob3A
557	ACAAACACTTCTACTATTCTTTGTACAGAGATGAACCTCATAGACCGCAAGGAGCTAGAGCCTTTGAAGA	HsMob3B
557	ACAAACACTTCTACTATTCTTTCATCCGCGAGTTCAGTCTGGTGGACAGCGGGAGCTGGAGCCACTGAGGA	HsMob3C
630	AATGACCGCCCGGATCTGCACTGA	HsMob3A
627	AATGACGAGCAGGATCTGCACTAA	HsMob3B
627	GATGACAGACCGGATCTGCACTGA	HsMob3C

Figura 3.8 – Alinhamento da região codificante das sequências das diferentes hsMob3 humanas.

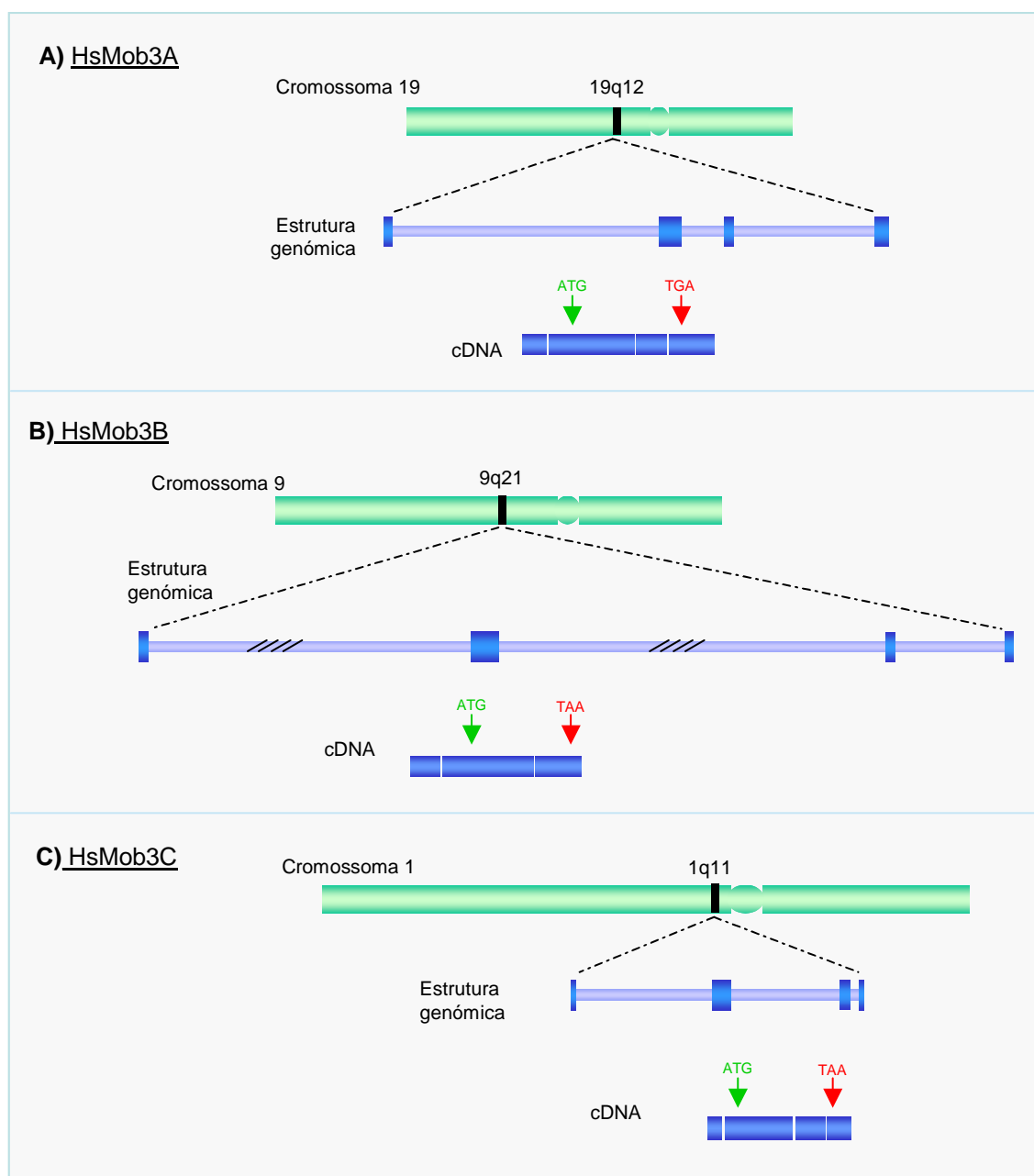


Figura 3.9 – Mapa genómico de *hsMob3A*, *B* e *C*. Localização citogenética e estrutura do gene. A azul escuro estão representados os intrões e a azul claro os exões

1) hsMob3A

```

GC GGGAGAGCTGTGGGGCTTGGTGAGTGTTCCTGGGCCTCTCGGGTTGGTCAGCACCCAGCCAGCTGGCCAGGACCCCTCTACAGAA 90
GTCCAGGAGAGCAGGCGCTACCAAGATGTCCTCAACCCCTTCTGAAGCAAGTCTTCAACAAGGACAAGACATTCGCCCCCAAGCGCAAGTT 180
      M S N P F L K Q V F N K D K T F R P K R K F
TGAGCCAGGCACCCAGCGCTTCGAGCTGCACAAGAAGGCGCAGGCGTCTGAAACGCCGGGCTGGACCTGCGGGCTGGCCGTGAGTTGCC 270
      E P G T Q R F E L H K K A Q A S L N A G L D L R L A V Q L P
CCCGGGCGAGGACCTGAACGACTGGGTGGCTGTTACGTGGTGGACTTCTTTAACCGCGTCAACCTCATCTACGGCACCATCAGCGACGG 360
      P G E D L N D W V A V H V V D F F N R V N L I Y G T I S D G
CTGCACGGAGCAGTCTGCCCGCTCATGTCTGGGGGGCCCAAGTATGATACCGCTGGCAGGATGAGCATAGTTCCGGAAGCCACGGC 450
      C T E Q S C P V M S G G P K Y E Y R W Q D E H K F R K P T A
ACTCTCCGCGCCAGGTACATGGACCTGCTGATGGACTGGATCGAGGCGCAGATCAACAACGAGGACCTCTTCCCCACCAACGTTGGCAC 540
      L S A P R Y M D L L M D W I E A Q I N N E D L F P T N V G T
TCCGTTTCCCAAGAACTTCTCGACAGCGTGGCGAAGATCTGTCTCGCGGCTGTTCCGCGTGTTCGTGTCACGCTCATATCCACCACTTTGA 630
      P F P K N F L Q T V R K I L S R L F R V F V H Y I H H F D
CCGCATCGCGCAGATGGGCTCCGAGGCCACGTGAACACCTGTACACGACCTTCTACTATTTCTGTCAGGAGTTCCGGCTCATCGACAC 720
      R I A Q M G S E A H V N T C Y K H F Y Y F V K E F G L I D T
CAAGGAGCTGGAGCCACTGAAAGAAATGACCGCCCGGATGTGCCACTGAGAGCCCGCGGGTCTCCCGGTGCCGAAACCGCCCTGGGGC 810
      K E L E P L K E M T A R M C H .
CTCGGAGACTTGAGGAGGAGCCTCTGGAACCATCATCCCGCTTCTCTCCGGCTGAGCATTTCAGGGAGACAGGGGGCCGAGCGCGTG 900
AGCAGGTGTTGGTCTCTCAGGAGCTCCAACCCCGGACGGCAGATGCCCTTCTCAGTGCTCGAGCCTCAGTCTCCCGCTGGGACTAAAACG 990
TGAACTCTGTAAATTCATGTGTACTAGCAACCGGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAATGA 1054

```

2) hsMob3B

```

ATGTCCATAGCCCTGAAGCAGGTATTCAACAAGGACAAGACCTTCCGACCCAAGAGGAAATTTGAACCTGGCACACAGAGGTTTGAGCTG 90
      M S I A L K Q V F N K D K T F R P K R K F E P G T Q R F E L
CACAAACGGGCTCAGGCATCCCTCAACTCGGGTGTGGACTGAAAGCGGCTGTGAGTTGCCAGTGGGGAGGACCAAGATGACGGGTG 180
      H K R A Q A S L N S G V D L K A A V Q L P S G E D Q N D W V
GCAGTACATGTGGTGGACTTCTTCAATCGGATCAACCTCATCTATGGCACCATCTGTGAGTTCTGCACCGAGCGGACCTGTCTGTGATG 270
      A V H V V D F F N R I N L I Y G T I C E F C T E R T C P V M
TCAGGGGGCCCAATATGAGTATCGGTGGCAGGATGATCTCAAGTATAAGAAGCCAACAGCGCTGCCAGCTCCCAAGTACATGAACCTT 360
      S G G P K Y E Y R W Q D D L K Y K K P T A L P A P Q Y M N L
CTTATGGATTGGATTGAGTTTCAGATCAACAACGAGGAAATATTTCCAAATGCGTGGGTGTTCCCTTCCAAAGAACTTCTCTCAGATC 450
      L M D W I E V Q I N N E E I F P T C V G V P F P K N F L Q I
TGCAAGAAGATCTGTGCGCGCTTTTCCGGGTCTTTGTCTCACGCTCATATCCACCACCTTCGACCGGGCTATTGTGATGGGTGCAGAGGCC 540
      C K K I L C R L F R V F V H V Y I H H F D R V I V M G A E A
CATGTCAACACCTGCTACAAACACTTCTATTACTTTGTACAGAGATGAACCTCATAGACCGCAAGGAGCTAGAGCCTTTGAAAGAAATG 630
      H V N T C Y K H F Y Y F V T E M N L I D R K E L E P L K E M
ACGAGCAGGATGTGTCACTAA 651
      T S R M C H .

```

3) hsMob3C

```

ATGGCCCTGTGCTGAAGCAGGTGTTTCGCCAAGGACAAGACGTTCCGGCCCGCGGAAGCGCTTTGAGCCGGGCACACAGCGCTTTGAGCTG 90
      M A L C L K Q V F A K D K T F R P R K R F E P G T Q R F E L
TACAAGAAGGCACAGGCTCTCTCAAGTCGGGCTGGACCTGCGCAGTGTGGTGAGGCTACCAACCGGGGAGAACATCGACGACTGGATC 180
      Y K K A Q A S L K S G L D L R S V V R L P P G E N I D D W I
GCCGTGACGTGGTGGACTTCTTCAACCGCATCAACCTCATCTACGGCACTATGGCGGAGCGCTGCAGTGAGACCAAGCTGCCCGGTCTATG 270
      A V H V V D F F N R I N L I Y G T M A E R C S E T S C P V M
GCCGGCGGGCCCGCTACGAGTACCGCTGGCAGGACGAGCGCCAGTACCGGCGGGCCGCAAGCTCTCTGCGCCGCGCTATATGGCATTG 360
      A G G P R Y E Y R W Q D E R Q Y R R P A K L S A P R Y M A L
CTCATGGACTGGATCGAAGGCCCTCATCAACGACGAAGAGGCTTTTCCACGCGTGTGGAGTTCCCTTCCCTAAGAACTTCCAGCAGGTC 450
      L M D W I E G L I N D E E V F P T R V G V P F P K N F Q V
TGCACCAAGATCTGACCCGCTCTTCCGAGTCTTTGTCCATGTCTACATCCACCACCTTCGATAGCATCTCAGCATGGGGCAGAGGCG 540
      C T K I L T R L F R V F V H V Y I H H F D S I L S M G A E A
CACGTCAACACCTGCTACAAGCACTTCTACTACTTCATCCGCGAGTTCACTGTGGTGGACGAGCGGAGCTGGAGCCACTGAGGGAGATG 630
      H V N T C Y K H F Y Y F I R E F S L V D Q R E L E P L R E M
ACAGAGCGGATCTGCCACTGA 651
      T E R I C H .

```

Figura 3.10 - As proteínas tipo hsMob3. 1) cDNA e tradução de hsMob3A. Encontram-se sublinhados a cauda poli-A (a azul), o codão de iniciação (a verde) e os codões STOP (a vermelho) observados imediatamente antes e depois da sequência codificante de hsMob3A. 2) Região codificante e tradução de hsMob3B. 3) Região codificante e respectiva sequência de aminoácidos de hsMob3C.

3.2.4 A proteína hsMob4

Como já foi referido no início deste capítulo, em células humanas parecem existir pelo menos duas proteínas tipo hsMob4: hsMob4A e hsMob4B. Relativamente às proteínas da família Mob1 em humanos, as proteínas tipo hsMob4 são as mais idênticas à proteína de Mob1 de levedura: 44%. As proteínas tipo hsMob4 são muito mais semelhantes entre si do que as hsMob3, diferindo apenas em 9 aminoácidos não contínuos que não parecem formar um domínio (figura 3.11)- A identidade entre hsMob4A e hsMob4B é 96%.

1	MSFLFGSRSSKTFKPKKNIPGSGHQYELLKHAEATLGSGNLRMAVMLPEG	hsMob4A
1	MSFLFSSRSSKTFKPKKNIPGSGHQYELLKHAEATLGSGNLRQAVMLPEG	hsMob4B
51	EDLNEWVAVNTVDFFNQINMLYGTITDFCTEESCPVMSAGEKRYEYHWADG	hsMob4A
51	EDLNEWIAVNTVDFFNQINMLYGTITDFCTEASCPVMSAGEPRYEYHWADG	hsMob4B
101	TNIKKPIKCSAPKYIDYLMTWVQDQLDDETLFPISKIGVPPPKNFMSVAKT	hsMob4A
101	TNIKKPIKCSAPKYIDYLMTWVQDQLDDETLFPISKIGVPPPKNFMSVAKT	hsMob4B
151	ILKRLFRVYAHIIHQHFDPIVQLQBEAHLNTSFKHFIFFVQEFNLIDRRE	hsMob4A
151	ILKRLFRVYAHIIHQHFDPIVQLQBEAHLNTSFKHFIFFVQEFNLIDRRE	hsMob4B
201	LAPLQELIEKLTSKDR	hsMob4A
201	LAPLQELIEKLISKDR	hsMob4B

Figura 3.11 – Comparação das sequências de aminoácidos de hsMob4B e hsMob4A. A azul indicam-se os aminoácidos comuns às duas proteínas. O rectângulo azul indica um local *consensus* de somulização em hsMob4A que não existe em hsMob4B.

Pela comparação das sequências proteicas de hsMob4A e hsMob4B, e dada a enorme semelhança existente entre ambas, poder-se-ia pensar que estas proteínas seriam polimorfismos de um mesmo gene. No entanto, o alinhamento das sequências de DNA das regiões codificantes das duas Mob4 humanas, mostra que elas são apenas 78% idênticas, divergindo frequentemente no 3º nucleotídeo de cada codão (Figura 3.12). Esta divergência aumenta significativamente se alinharmos também a região transcrita e não traduzida, e passa a ser 51%.

Para além disso, foi também possível encontrar duas regiões genómicas diferentes para o hsMob4A e para o hsMob4B. A pesquisa na base de dados do genoma humano indica que o hsMob4A se localiza cromossoma 4 na região genómica 4q22; por outro lado, o hsMob4B mapeia na região 2q19 do cromossoma 2 (Figura 3.13). Todos estes dados permitem concluir que estamos na presença de dois genes distintos. A estrutura genómica dos dois Mobs4 humanos é bastante semelhante - ambos têm 6 exões e 5 intrões, o codão

de iniciação localiza-se no primeiro exão e o codão STOP no último exão. A diferença maior é ao nível do primeiro intrão que no caso do hsMob4A tem 56 316 pb, enquanto o do hsMob4B tem só 5909 pb.

1	ATGAGCTTCTTGGTTGGTAGTCGCTCTTCTAAACCTTTAAACCAAAGAAGAACATTCCAGAGGGTTCTC	hsMob4A
1	ATGAGCTTCTCTTCAGCAGCCGCTCTTCTAAACATTCAAACCAAAGAAGAAATATCCCTGAAGGATCTC	hsMob4B
71	ACCAGTATGAGCTCTTAAACACGCAGAAGCCACACTTGGCAGTGGCAACCTTCGGATGGCTGTTCATGCT	hsMob4A
71	ATCAGTATGAACCTCTTAAACATGCAGAAGCAACTCTAGGAAGTGGGAATCTGACACAACTGTTATGTT	hsMob4B
141	TCCTGAAGGGGAAGATCTCAATGAATGGGTTGCAGTTAACTGTGGATTTCTTCAATCAGATCAACATG	hsMob4A
141	GCCTGAGGGAGAGGATCTCAATGAATGGATTGCTGTGAACACTGTGGATTTCTTTAACCAGATCAACATG	hsMob4B
211	CTTTATGGAACATCACAGACTTCTGTACAGAAGAGAGTTGTCCAGTGTGTACGCTGGCCCAAAATATG	hsMob4A
211	TTATATGGAACATTTACAGAACTTCTGCACTGAAGCAAGCTGTCCAGTCATGTCTGCAGTCCGAGATATG	hsMob4B
281	AGTATCATTTGGGCAGATGGAAAGAACATAAAGAAACCTATTAAAGTGCTCTGCACCAAAAGTATATTGATTA	hsMob4A
281	AATATCACTGGGCAGATGGTACTAATATTAAAAAGCCAATCAAATGTTCTGCACCAAAATACATTGACTA	hsMob4B
351	CTTGATGACTTGGGTTCAAGGACAGTTGGATGATGAGACGTTATTTCCATCAAAAATTGGTGTCCCGTTC	hsMob4A
351	TTTGATGACTTGGGTTCAAGATCAGCTTGATGATGAACCTCTTTTTCCTCTAAGATTGGTGTCCCATTT	hsMob4B
421	CCAAAGAAATTTATGTCTGTGGCAAAACTATACTCAAACGCCTCTTTAGGGTTTATGCTCACATTTATC	hsMob4A
421	CCCAAAAACCTTTATGTCTGTGGCAAAAGACTATTCTAAAGCGTCTGTTTCAAGGGTTTATGCCATATTTATC	hsMob4B
491	ATCAGCATTTTGACCTGTGTATCCAGCTTCAGGAGGAAGCACATCTAAATACATCTTTCAAGCACTTTAT	hsMob4A
491	ACCAGCACCTTTGATTCTGTGATGCAGCTGCAAGAGGAGGCCACCTCAACACCTCCTTTAAGCACTTTAT	hsMob4B
561	TTTTTTTGTCCAGGAATTCAACCTTTATGATAGAAAGAACTTGCACCACTCCAAGAACTGATTGAAAAA	hsMob4A
561	TTTCTTTGTTCAGGACTTTAATCTGATTGATAGGCTGTGAGCTGCACCTCTTCAAGAATTAAATAGAGAAA	hsMob4B
631	CTCACC TCAAAAGACAGATAA	hsMob4A
631	CTTGGAT TCAAAAGACAGATAA	hsMob4B

Figura 3.12 – Alinhamento das sequências das regiões codificantes de hsMob4A e hsMob4B. A rosa indicam-se os nucleotídeos idênticos.

Encontram-se depositados no GenBank muito mais ESTs para hsMob4B do que para hsMob4A¹. Sendo os ESTs codificantes para hsMob4A de embrião, fígado fetal, pulmão, rim, próstata, células B e cérebro; e os ESTs de hsMob4B da placenta, pâncreas, pele, pulmões, testículos, olho, intestino, estômago, mama, embrião, cérebro e células B. Estas observações só indicam que os Mob4A e Mob4B são expressos nos tecidos/células referidas, não sendo de forma nenhuma exclusivas para os tecidos não referidos (observação aliás válida para todos os outros Mobs). Pudemos ainda verificar por RT-PCR e sequenciação dos respectivos produtos que existem mRNAs de hsMob4A e hsMob4B em células HeLa. (Para esta experiência, desenharam-se primers específicos para hsMob4A e para hsMob4B fora das regiões codificantes de ambos os genes, diminuindo o risco de amplificação inespecífica). De seguida, e por último, apresentam-se as sequências do cDNA

¹ Na pesquisa realizada para escrever este capítulo, encontraram-se quatro vezes mais ESTs codificantes para hsMob4B do que para hsMob4A.

do hsMob4A e a região codificante do hsMob4B com as respectivas traduções (figuras 3.14 e 3.15).

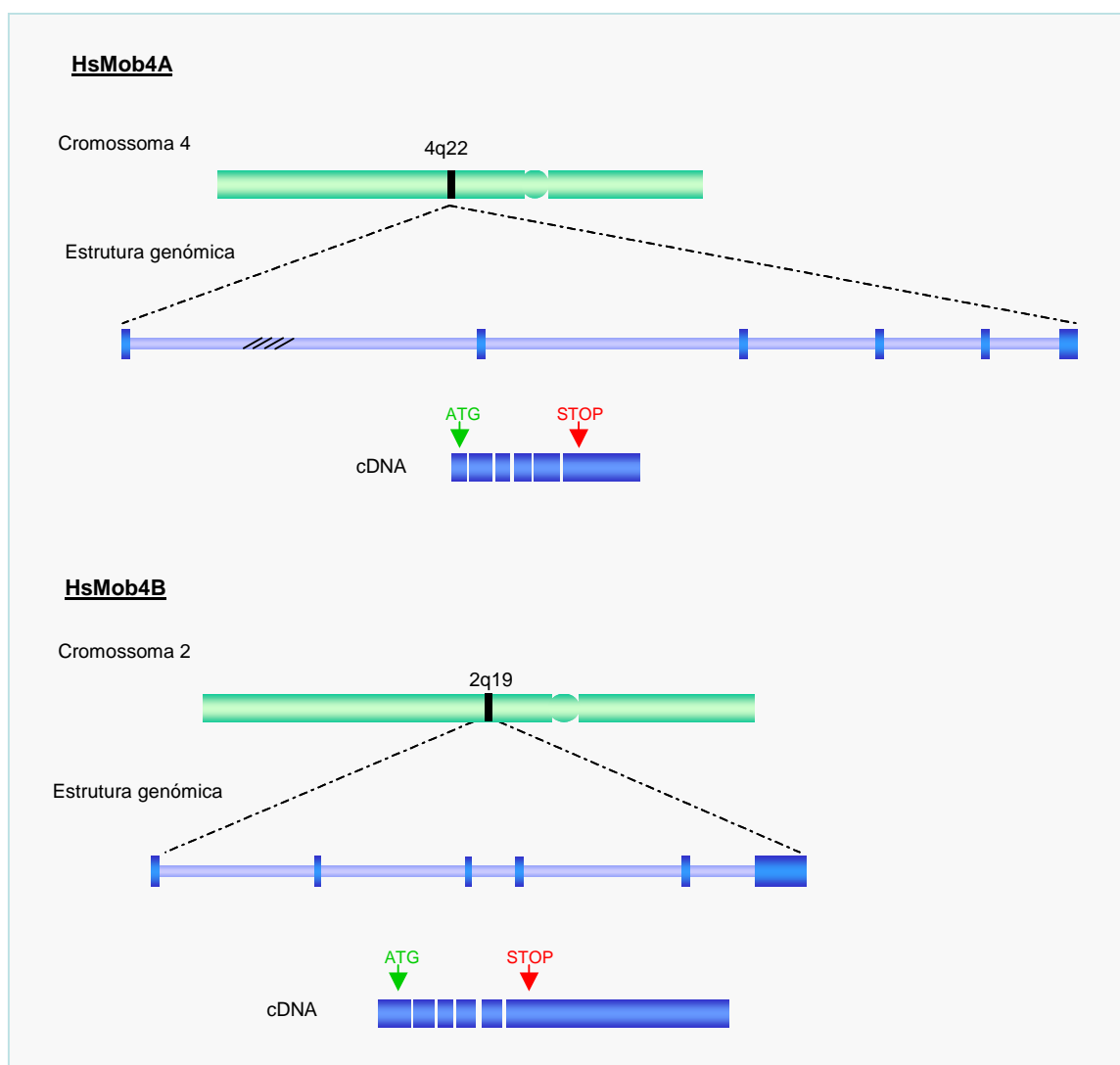


Figura 3.13 – *Mapa genômico de hsMob4A e hsMob4B*. Localização citogenética e estrutura do gene. A azul escuro estão representados os intrões e a azul claro os exões

3.3 Discussão

Neste capítulo apresentou-se e caracterizou-se sumariamente a família de genes tipo Mob em humanos. Interessantemente, encontram-se genes codificantes para proteínas tipo Mob em todos os organismos eucariotas analisados, o que sugere funções importantes e conservadas para esta família de proteínas.

GAATTCGGCAGGAGTTCCATTGCGCTTTCTCTTTCTTCTGGCCCCAGCCGCTCCGAGGCGCTCGCGACCGCGGAGCCTGCAGCCTGCC 90
CCGCGGCCAACATGAGCTTCTTGTTGGTAGTCGCTCTTTTAAAACTTTTAAACCAAGAAGAACATTCCAGAGGGTTCTCACCAGTATG 180
M S F L F G S R S S K T F K P K K N I P E G S H Q Y
AGCTCTTAAAAACGCGAGAAGCCACACTTGGCAGTGGCAACCTTCGGATGGGTGTCATGCTTCTTGAAGGGGAAGATCTCAATGAATGGG 270
E L L K H A E A T L G S G N L R M A V M L P E G E D L N E W
TTGCAGTTAACTGTGGATTTCTTCAATCAGATCAACATGCTTTATGGAATATCACAGACTTCTGTACAGAAGAGAGTTGTCAGTGA 360
V A V N T V D F F N Q I N M L Y G T I T D F C T E E S C P V
TGTCAGCTGGCCCCAAATATGAGTATCATTGGGCAGATGGAACGAACATAAAGAAACCTATTAAGTGCTCTGCACCAAAGTATATTGATT 450
M S A G P K Y E Y H W A D G T N I K K P I K C S A P K Y I D
ACTTGATGACTTGGGTTGAGGACAGTTGGATGATGAGACGTTATTTCCATCAAAAATTTGGTGTCCCGTTCCCAAAGAATTTTCATGTCTG 540
Y L M T W V Q D Q L D D E T L F P S K I G V P F P K N F M S
TGGCAAAACCTATACTCAAACGCTCTTTTAGGGTTATGCTCACATTTATCATCAGCATTTTGACCGTGTGATCCAGCTTCAGGAGGAAG 630
V A K T I L K R L F R V Y A H I Y H Q H F D P V I Q L Q E E
CACATCTAAATACATCTTTCAAGCACTTTATTTTTTTTGTCCAGGAATTCACCTTATTGATAGAAGAGAACTTGCACCACTCCAAGAAC 720
A H L N A T S C K H F I F F V Q E F N L I D R R E L A P L Q E
TGATTGAAAAACTCACCTCAAAGACAGATAAAGGATGCAGAGCTGTGCAAATTTGTTCTCTCAAATGAAGCAGTGTGGAGTGTATTGGGG 810
L I E K L T S K A D R .
ATTTTGTATATTTTGTTTTTATCTGGATTGTTTTTGTCTTAGTTTGGGGCGGGGGCTTGTTTGGGTTCCTTTTTCTTTATTCTGATT 900
ATGTGAAACCATAATTCTATTGCTAGGGGAAGCCAAGAACCATTCTCTATACACTTGATAAGGGTAAATTTATCTTAGTGTTTTTAAACTT 990
GGTTTTGGTTACTTGAGGAGTTTTTTAATAATATTGTGTGCTGCAAGAAAGTGCTTGTGATTGAACTGCCGATGGATTGGTTTCTGTGT 1080
GGTATAAATTTGTGGCCCATTTATGAAGTCCCCAAAGAGTTATGTTTTTAAGTGCTTGGCAGGCTCACTTCTGAGGTGCAAAACATAGA 1170
TATAGAAGTGAACAGGGCTTGAAACAATATTAGGATTACTACCCAGGGCACTTACTGTGTCATGTTGTAACATATCTATGATAAAAGCCA 1260
TAGTTTACCTAAAAAATACTGAG 1294

Figura 3.14 – *cDNA de hsMob4A*. Encontram-se sublinhados o codão de iniciação (a verde), o codão STOP (a vermelho) e a cauda poli-A (a azul). Não se encontrou um codão STOP na mesma fase de leitura que a primeira meteonina.

ATGAGCTTCTCTTTCAGCAGCGCTCTTCTTAAAAATTCAAACCAAGAAGATATCCCTGAAGGATCTCATCAGTATGAACTCTTAAAA 90
M S F L F S S R S S K T F K P K K N I P E G S H Q Y E L L K
CATGCAGAAGCAACTCTAGGAAGTGGGAATCTGAGACAAGCTGTTATGTTGCCTGAGGGAGAGGATCTCAATGAATGGATTGCTGTGAAC 180
H A E A T L G S G N L R Q A V M L P E G E D L N E W I A V N
ACTGTGGATTCTTTAAACGATCAACATGTTATATGGAACATTACAGAATTCGCACTGAAGCAAGCTGTCCAGTCATGTCTGCAGGT 270
T V D F F N Q I N M L Y G T I T E F C T E A S C P V M S A G
CCGAGATATGAATATCACTGGGCAGATGGTACTAATATTA AAAAGCCAAATCAAATGTTCTGCACCAAAATACATTGACTATTTGATGACT 360
P R Y E Y H W A D G T N I K K P I K C S A P K Y I D Y L M T
TGGGTTCAAGATCAGCTTGATGATGAAACTCTTTTTCTTCTAAGATTGGTGTCCCAATTTCCCAAAAACTTTATGTCTGTGGCAAAGACT 450
W V Q D Q L D D E T L F P S K I G V P F P K N F M S V A K T
ATTCTAAAGCGTCTGTCTAGGGTTTATGCCCATATTTATCACCAGCACTTTGATTCTGTGATGCAGCTGCAAGAGGAGGCCCCACCTCAAC 540
I L K R L F T T V Y A H I Y H Q H F D S V M Q L Q E E A H L N
ACCTCCTTTAAGCATTTTATTTCTTTGTTCAAGGATTTAATCTGATTGATAGGCGTGAGCTGGCACCTCTTCAAGAATTAATAGAGAAA 630
S S F K H F I F F V Q E F N L I D R R E L A P L Q E E L I E K
CTTGGATCAAAAGACAGATAA 651
L G S K D R .

Figura 3.15 – *Região codificante de hsMob4B*. Encontram-se sublinhados o codão de iniciação (a verde), o codão STOP (a vermelho).

Relativamente ao gene *hsMob1* encontraram-se ESTs codificantes para duas possíveis formas da proteína, o que sugere que o mRNA de *hsMob1* sofre um processamento alternativo. Existem vários métodos para identificar e validar o processamento alternativo de um gene (*Modrek & Lee, 2002*):

→ alinhar todos os ESTs da base de dados e verificar se faltam ou sobram “*blocos de DNA*”;

→ encontrar na base de dados mais do que um EST com o possível processamento alternativo;

→ localizar os diferentes cDNAs no mesmo *locus* genómico (uma homologia entre 95 a 100% de emparelhamento com a sequência genómica exclui muitos dos falsos candidatos a um possível processamento alternativo).

No caso do possível processamento alternativo de hsMob1 estas condições verificam-se pois:

→ encontraram-se quatro ESTs diferentes (em 52 analisados) aos quais era removida exactamente a mesma sequência de DNA;

→ o alinhamento deste cDNA no genoma humano prevê exactamente a mesma localização genómica do que a já descrita para hsMob1, com cinco exões com 100% de identidade no cromossoma 2 e um exão com 93% de identidade no mesmo cromossoma. Por estas razões, é possível que o gene hsMob1 tenha duas formas de processamento.

O processamento alternativo do RNA é um mecanismo de regulação da expressão génica muito relevante em eucariotas. Estudos recentes indicam que 35% a 59% dos genes humanos devem ter pelo menos uma forma de processamento alternativo (Modrek & Lee, 2002). Vários processos, desde a apoptose à determinação do sexo, apresentam processamento alternativo, e aproximadamente 15% das doenças genéticas podem ser derivadas de alterações na regulação deste evento (Modrek & Lee, 2002). No caso do hsMob1, não se sabe ainda a relevância biológica das duas formas de processamento. Estudos mais detalhados sobre hsMob1 poderão responder a essas questões.

No caso da subfamília dos genes hsMob3: hsMob3A, hsMob3B e hsMob3C, o resultado mais significativo que se encontrou, após a análise das suas sequências genómicas, foi a enorme variabilidade observada no tamanho dos intrões de cada gene. De facto, as evidências dos projectos de sequenciação dos vários genomas sugerem que os organismos procariotas são caracterizados por genomas compactos e com pouco DNA intergénico, enquanto os organismos eucariotas são caracterizados por terem genomas menos compactos onde acumulam grandes quantidades de DNA intergénico, intrões e sequências repetitivas. Genes que contêm intrões podem ter padrões de expressão extremamente diferentes quando comparados com versões sem intrões de genes idênticos (revisto por Hir *et al.*, 2003). Os intrões e o seu processamento alternativo podem influenciar o metabolismo do mRNA, como por exemplo a transcrição inicial do gene, a poli-adenilação, a exportação para fora do núcleo, a tradução e a degradação do mRNA (revisto por Hir *et al.*, 2003). A grande variabilidade observada nos intrões dos genes de hsMob3 pode

eventualmente reflectir uma expressão diferenciada destes genes e a estabilidade dos seus mRNAs, funcionando como um processo de regulação dos mesmos.

É possível que a duplicação destes genes tenha acontecido antes da separação da espécie humana, visto que em ratinho também se encontram 3 tipos de ESTs diferentes que codificam para as proteínas da família de mMob3 (Mob3 de ratinho): mMob3A, mMob3B e mMob3C. Estas são exactamente iguais às proteínas humanas. Este estudo permitiu assim concluir que em humanos (e em ratinho) as proteínas tipo Mob3 formam uma pequena subfamília constituída por três genes, que não parecem ter uma forte especificidade tecidual e que podem coexistir num mesmo tipo célula.

Finalmente, a subfamília de genes tipo hsMob4: hsMob4A e hsMob4B. É constituída por genes que codificam para proteínas com uma enorme identidade, onde possivelmente a diferença mais significativa entre ambas é que a hsMob4A possui uma sequência consenso para somulização (PKYE) e a hsMob4B não. A sequência consenso de somulização é Ψ KXE, onde Ψ é um aminoácido hidrofóbico, K é a lisina aceitadora, X é um aminoácido qualquer e E é um ácido glutâmico (Sampson *et al.* 2001). A somulização é um processo de modificação pós-traducional bastante regulado em eucariotas, que está envolvido em diversos eventos como, por exemplo, o transporte nuclear, a regulação transcripcional, a segregação cromossómica e o controlo do ciclo celular. A possível somulização de hsMob4A e não de hsMob4B poderá, eventualmente, modificar especificamente a localização de hsMob4A, ou alterar a sua capacidade de se ligar a outras proteínas, podendo originar funções celulares diferentes para a hsMob4A e para a hsMob4B.

Assim como nos humanos, também se encontram em ratinho dois Mob4 distintos, codificantes para proteínas exactamente iguais às hsMob4A e a hsMob4B (humanas), o que sugere que esta duplicação génica também aconteceu antes da separação da espécie humana.

As famílias de genes parecem ter surgido, evolutivamente, através de um processo de duplicação de um gene ancestral, seguido de especialização estrutural e divergência de ambas as cópias (revisto em Fryxell, 1996). A família dos genes tipo Mob deverá ter sofrido vários eventos de duplicação durante a evolução, pois ao analisar os genes Mob desde a levedura ao Homem detecta-se um aumento de dois para sete genes. Alguns desses eventos de duplicação poderão ter-se dado bastante cedo na escala evolutiva, visto que organismos invertebrados e simples como *Drosophila* e *C. elegans* têm já quatro genes tipo Mob, e que definem os quatro grandes ramos da família de proteínas tipo Mob, apresentadas no início do capítulo (figura 3.2).

São actualmente aceites várias teorias que explicam a evolução das famílias de genes: a hipótese de dois ciclos de duplicação dos genomas, a hipótese do big bang

(duplicação em grande escala), e a hipótese contínua (geração contínua de novos genes por duplicação em pequena escala) (Gu *et al.*, 2002). De notar no entanto que estas teorias não são exclusivas. Poder-se-à assim pensar que houve um grande evento de duplicação da levedura para *C.elegans/Drosophila*, que originou os quatro grandes ramos da família Mob, e que seguidamente se deu uma duplicação em pequena escala dos genes Mob3 e Mob4 em mamíferos, formando as duas subfamílias apresentadas.

A divergência dos genes tipo Mob poderá ter dado origem a diferentes funções para cada Mob humano. Fryxell (1996) propôs que a aquisição de uma nova função por um gene que tenha sido duplicado poderá ser facilitada por uma heterogeneidade pré-existente de proteínas que interagem directamente com o produto do gene duplicado, obtendo-se então uma especialização e divergência de funções de genes originados de um mesmo ancestral comum. Como foi descrito na introdução, a proteína scMob1 interage com a proteína Mps1 (Luca & Wyney, 1998), com as proteínas Dbf2/Dbf20 (Komarnitsky *et al.* 1998), e o complexo Dbf2/Mob1 é fosforilado pela cinase cdc15 (Mah *et al.* 2001). Outros exemplos que suportam a hipótese da família de proteínas tipo Mob ter evoluído para uma especialização dos seus constituintes, são a família das tubulinas e a família das Cdc 14. A família das tubulinas está dispersa por todo o reino eucariótico, na qual se observa uma grande divergência/especialização de funções. Um outro exemplo de uma duplicação/especialização de genes é o do gene Cdc14. Em leveduras existe apenas um gene codificante para a fosfatase Cdc14 e em humanos existem dois: Cdc14A e Cdc14B (Li *et al.*, 2000). A proteína cdc14 de *S.cerevisiae* está na mesma via de sinalização de saída de mitose que a scMob1, e pensa-se que promove a saída de mitose por acção do complexo Dbf2/Mob1 (Lee *et al.* 2001). No entanto, não se pode excluir a hipótese delas serem redundantes ou pelo menos em parte complementares. O objectivo deste trabalho não era estudar detalhadamente a evolução da família dos genes tipo Mob, mas sim pesquisar a função dos genes Mob em células humanas. Decidimos então centrar a nossa atenção no estudo das proteínas mais homólogas à scMob1, as proteínas hsMob4A e hsMob4B.

4. Caracterização celular de hsMob4

De todas as proteínas tipo Mob em humanos, as proteínas hsMob4 são as que apresentam maior homologia com a Mob1 inicialmente descrita em levedura. Decidiu-se então caracterizar em detalhe a função destas proteínas.

4.1 Validação do anticorpo anti-hsMob4

Utilizou-se neste trabalho um soro policlonal de coelho criado contra a proteína Mob1 de *Xenopus leavis*, gentilmente cedido por Diddier Fesquet. Este soro será designado de anti-Mob4 e, após a sua purificação por afinidade, será referido como anti-Mob4(ap) (que reconhece apenas Mob4). Após a confirmação que o soro anti-Mob4 reconhece as proteínas hsMob4A e hsMob4B, utilizou-se para todos os restantes estudos desta tese o anticorpo purificado por afinidade: anti-Mob4(ap) (este anticorpo foi purificado por Diddier Fesquet).

A proteína Xmob1 é bastante semelhante às proteínas hsMob4A e hsMob4B, sendo respectivamente, 94% e 96,7% idêntica a cada uma delas (figura 4.1).

Tendo em conta de que se trata de um soro policlonal contra a proteína Xmob1 completa, e dada a enorme semelhança existente com ambas as Mobs4 humanas, pensou-se que este provavelmente reconheceria também as hsMob4A e hsMob4B. Efectivamente, em Western Blots o soro anti-Mob4 é capaz de reconhecer especificamente as proteínas hsMob4A e hsMob4B expressas em bactéria.

A proteína hsMob4A (produzida em *E. coli*) foi então utilizada para imunodeplectar/imunopurificar o soro total de anti-Mob4. Pode observar-se no Western Blot apresentado na figura 4.2, que o soro total reconhece várias proteínas no extracto de células HeLa. Uma dessas proteínas migra com um peso molecular aparente de 31,6 kDa, que é um valor aproximado ao valor esperado para as hsMob4. O soro imunodeplectado, por outro lado, não a reconhece. Quando se utiliza o soro purificado por afinidade, essa banda de 31,6 kDa é detectada novamente. Estes resultados permitem concluir que a banda indicada com a seta vermelha na figura 4.2 corresponde a hsMob4 endógeno. É de referir que o soro purificado reconhece também uma proteína que migra com um peso molecular aparente de cerca de 80 kDa. Esta não deverá estar relacionada com as hsMob4 pois, como se pode observar nos resultados com o soro imunodeplectado, esta banda é igualmente detectada.

A análise dos resultados obtidos da incubação do soro total, imunodeplectado e imunopurificado, sugere que as células HeLa expressam hsMob4, e que o soro anti-Mob4 utilizado, quando purificado, reconhece especificamente a(s) hsMob4 endógena(s). Não se

sabe no entanto, se a banda de 31,6 kDa corresponde a hsMob4A, hsMob4B ou a ambas (muito provavelmente a ambas¹).

1	MSFLFS--RSSKTFKPKKNIPEGSHQYELLKHAEATLGSGNLRQAVMLPEG	XMob1
1	MSFLFGSRSSKTFKPKKNIPEGSHQYELLKHAEATLGSGNLRMAVMLPEG	HsMob4A
1	MSFLFSSRSSKTFKPKKNIPEGSHQYELLKHAEATLGSGNLRQAVMLPEG	HsMob4B
50	EDLNEWIAVNTVDFFNQINMLYGTITFCTESTGCVMSAGPRYEYHWADG	XMob1
51	EDLNEWIAVNTVDFFNQINMLYGTITDFCTEESCQVMSAGEKYEYHWADG	HsMob4A
51	EDLNEWIAVNTVDFFNQINMLYGTITFCTEASGCVMSAGPRYEYHWADG	HsMob4B
100	TNIKKPIKSAPKYIDYLMTWVQDQLDDETLFPSKIGVPFPKNFMSVAKT	XMob1
101	TNIKKPIKSAPKYIDYLMTWVQDQLDDETLFPSKIGVPFPKNFMSVAKT	HsMob4A
101	TNIKKPIKSAPKYIDYLMTWVQDQLDDETLFPSKIGVPFPKNFMSVAKT	HsMob4B
150	ILKRLFRVYAHYHQHFDVVMQLQEEAHLNTSFKHFIFFVQEFNLIDRRE	XMob1
151	ILKRLFRVYAHYHQHFDVVIQLQEEAHLNTSFKHFIFFVQEFNLIDRRE	HsMob4A
151	ILKRLFRVYAHYHQHFDVVMQLQEEAHLNTSFKHFIFFVQEFNLIDRRE	HsMob4B
200	LAPLQELIEKLGSKDR	XMob1
201	LAPLQELIEKLISKDR	HsMob4A
201	LAPLQELIEKLGSKDR	HsMob4B

Figura 4.1 – Comparação das sequência polipeptídicas das proteínas XMob1, hsMob4A e hsMob4B. A azul indicam-se os aminoácidos conservados com XMob1.

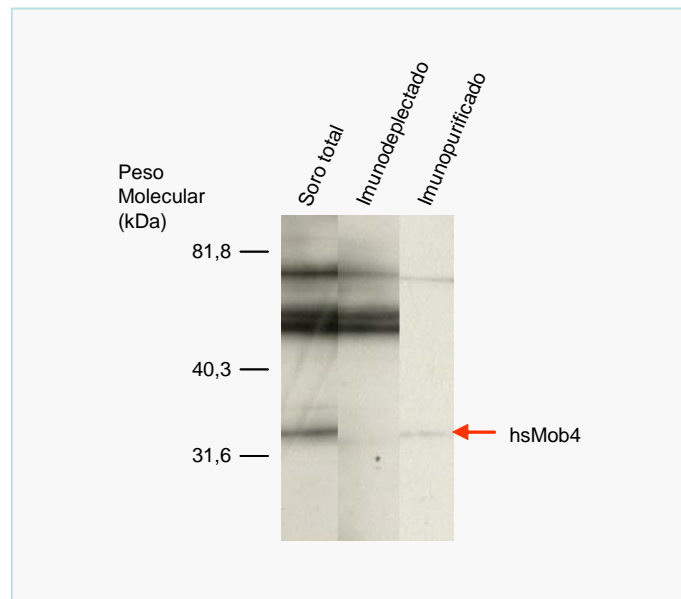


Figura 4.2 – Análise por Western Blot do soro anti-Mob4 completo, soro imunodeplectado e soro inunopurificado.

¹ De lembrar que os resultados obtidos por RT-PCR (capítulo 3) revelaram a presença de mRNAs codificantes para hsMob4A e hsMob4B em células HeLa, sugerindo que esta linha celular deveria

As proteínas hsMob4 endógenas reconhecidas pelo soro anti-Mob4(ap) serão doravante designadas por hsMob4.

Com o objectivo de confirmar que o anticorpo reconhece tanto a hsMob4A como a hsMob4B, expressou-se em células HeLa a proteína hsMob4B em fusão com YFP². O clone que produz a proteína de fusão YFP.hsMob4B foi designado por dCF37 (ver Apêndice 3). Pode-se observar na figura 4.3a) que o anticorpo anti-GFP³ reconhece tanto a YFP (a banda detectada na pista A que tem o peso esperado, sendo a única detectada nesta pista) como a YFP.hsMob4B (detectada na pista B, com o peso molecular de aproximadamente 45 KDa, e que corresponde à soma das massas moleculares de YFP e Mob). Na pista C, de células não transfectadas, como esperado, não se detecta nenhuma banda.

Ao incubar-se a mesma membrana com o soro anti-Mob4, verificou-se que este detecta uma banda de 31 kDa, que deverá corresponder à hsMob4 endógena, e que na pista de YFP.hsMob4B se observa a mesma banda reconhecida pelo anticorpo α -GFP, o que indica que o anticorpo anti-Mob4 reconhece a proteína hsMob4B.

Também com a finalidade de mostrar que o soro anti-Mob4 reconhece tanto a proteína hsMob4A como a proteína hsMob4B, expressaram-se em células HeLa ambas as proteínas em fusão com o péptido V5, que é reconhecido especificamente pelo anticorpo R960-25 (invitrogen). Os clones que dão origem às proteínas de fusão hsMob4A.V5 e hsMob4B.V5 designam-se respectivamente de dCF38 e dCF36 (ver apêndice 3). Por Western Blot, após a incubação com o anticorpo anti-V5, verifica-se que tanto a hsMob4A.V5 como a hsMob4B.V5 são detectadas (figura 4.3b, painel esquerdo). Um Western Blot com amostras idênticas, mas incubado com o soro anti-Mob4, mostra que tanto hsMob4A.V5 como hsMob4B.V5 são igualmente reconhecidas (figura 4.3b painel direito). É ainda visível neste caso a reacção do soro com uma proteína de aproximadamente 31 kDa em todos os poços, incluindo nas células HeLa controlo, e que corresponderá à forma endógena da Mob4 (ou seja hsMob4A mais hsMob4B). A proteína endógena tem, como esperado, uma migração mais rápida, dado ser menor.

Deste conjunto de resultados pode-se então concluir que o soro criado contra a proteína Mob1 de *Xenopus* reconhece ambas as proteínas tipo Mob4 humanas. É importante acrescentar que este anticorpo não permite distinguir entre a hsMob4A e a hsMob4 e que, tendo em conta os resultados do RT-PCR, a banda observada em Western Blot de hsMob4 endógeno deverá corresponder a uma mistura de hsMob4 A e B.

produzir ambas as proteínas.

² A YFP é uma variante do GFP, que tem quatro substituições de aminoácidos. A fluorescência é amarela em vez de verde.

³Anticorpo anti-GFP é um soro policlonal de coelho, que reconhece as duas variantes de GFP (abcam, #ab290).

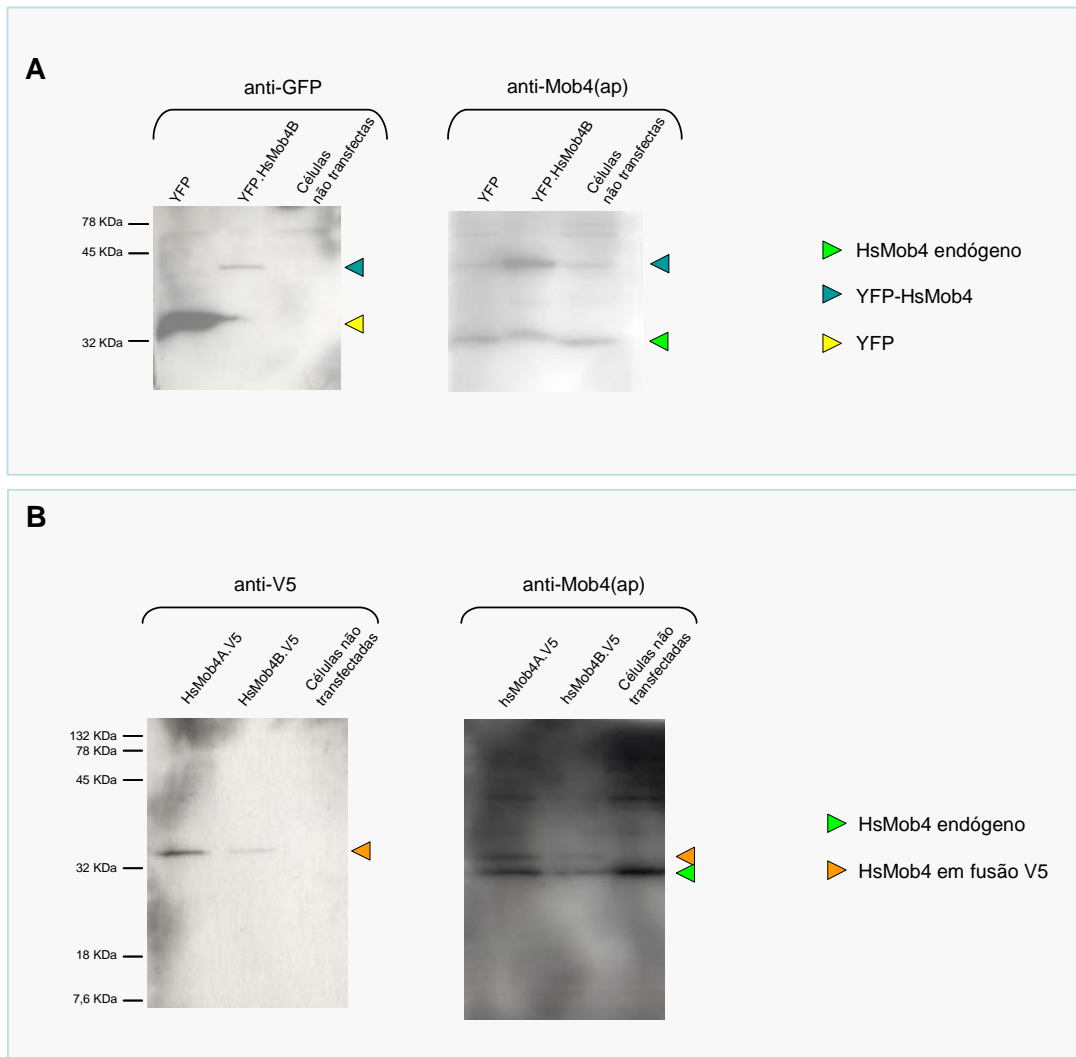


Figura 4.3 – O anticorpo anti-Mob4 reconhece hsMob4A e hsMob4B em Western Blot.

a) Membrana de Western realizado em extracto de células HeLa transfectadas com pEYFPC1, dCF37 e células não transfectadas. A mesma membrana foi incubada com anticorpos anti-GFP (direita) e anti-Mob4 (esquerda). **b)** Membrana de Western realizado em extracto de células HeLa transfectadas com dCF38, dCF36 e células não transfectadas. A mesma membrana foi incubada com anticorpos anti-V5 (direita) e anti-Xmob1 (esquerda).

4.2 Estabilidade da proteína hsMob4

A degradação de proteínas é um mecanismo regulatório frequente em células de eucariotas. Em particular ao longo do ciclo celular, várias proteínas são especificamente degradadas após exercerem a sua função. Por exemplo, aquando da saída de mitose em *S.cerevisiae*, a proteína Cdc14 é libertada do nucléolo, induzindo a degradação das ciclinas mitóticas e a consequente inactivação da cinase Cdc2 (Visintin *et al.* 1998). Por outro lado, um aumento da concentração intracelular de uma proteína numa determinada fase do ciclo celular está muitas vezes relacionada com uma função nessa fase do ciclo. Relativamente à

proteína scMob1, foi inicialmente sugerido que a concentração desta variava durante o ciclo celular (mas sem nunca ser totalmente degradada) e que teria um pico de abundância mesmo antes de mitose, na fronteira G2/M (Komarnitsky et al 1998). No entanto, estes resultados foram obtidos pela análise dos níveis de mRNA do *scMOB1* e, quando se analisaram os níveis da proteína scMob1 durante o ciclo celular (em *S. cerevisiae*), verificou-se que, apesar do mRNA do *scMOB1* variar bastante durante o ciclo celular, os níveis globais da proteína mantêm-se constantes (Luca et al, 2001).

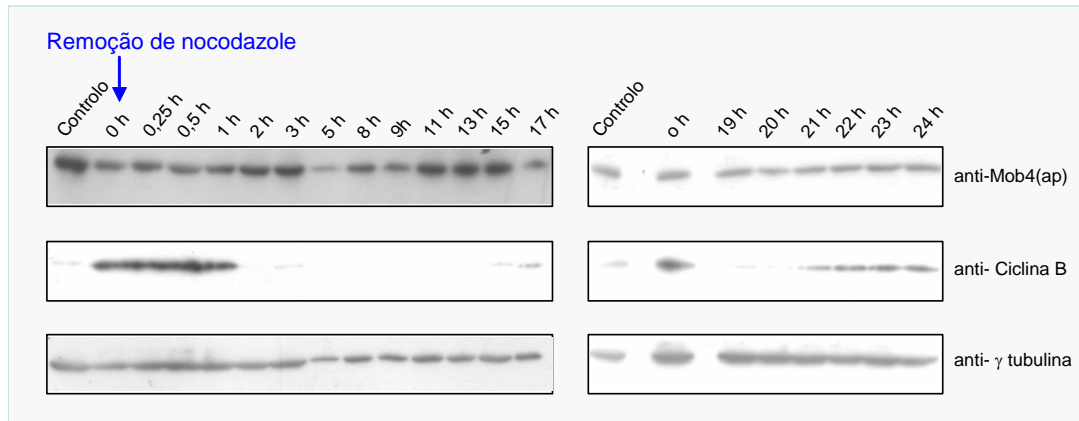


Figura 4.4 – Análise dos níveis de proteína *hsMob4* ao longo do ciclo celular. Células HeLa foram bloqueadas em prometafase com nocodazole durante 10h. Após libertação do do bloqueio retiraram-se amostras a diferentes tempos. Apresenta-se um Western Blot com as amostras retiradas. As membranas foram incubadas com anti-Mob4(ap), anti-ciclina B e com anti- γ -tubulina.

Pretendeu-se então verificar se em células humanas os níveis das proteínas *hsMob4* variam ao longo do ciclo. Para tal, prepararam-se extractos de células sincronizadas através da utilização de nocodazole. Quando na presença de nocodazole, as células páram num estado de prometafase. Este bloqueio pode ser revertido desde que a droga seja removida. As células foram bloqueadas incubando com nocodazole durante 10h, findas as quais se recolheram as células mitóticas por abanão (mitotic shake off). Estas células foram colocadas em meio novo e, após a remoção do bloqueio, recolheram-se células de hora a hora, sendo estas imediatamente lisadas. Recolheram-se amostras durante um ciclo celular completo (que é aproximadamente 21 h para células HeLa). As diferentes amostras foram depois analisadas por Western Blot (figura 4.4). Na figura 4.4, a boa sincronização da amostra é confirmada seguindo-se os níveis de ciclina B. Observa-se que a ciclina B desaparece quase completamente duas horas após a remoção do bloqueio (coincidindo com a saída de mitose e entrada em G1). Na mesma experiência, observa-se que os níveis de *hsMob4* são constantes (ou sujeitos a pequenas variações) durante o ciclo celular. A γ -tubulina foi também utilizada como controlo, tendo-se observado que os seus níveis proteicos não variam ao longo do ciclo, como esperado. Na amostra correspondente ao tempo 5h pode parecer que há uma ligeira degradação de *hsMob4*, mas no entanto a banda

correspondente à marcação pela γ -tubulina nesse ponto é também menos intensa, o que sugere que não houve uma degradação de hsMob4, mas sim a aplicação de uma menor quantidade de proteína no gel. Em conclusão, podemos dizer que os níveis da proteína hsMob4 endógenos (hsMob4A&B) são estáveis durante o ciclo celular.

4.3 Localização celular de hsMob4

Existem vários exemplos de proteínas que são activas apenas quando correctamente localizadas na célula. A localização celular de uma proteína pode assim fornecer pistas sobre a sua possível função e sobre possíveis parceiros moleculares. Para localizar ambas as proteínas hsMob4 na célula, foram utilizadas duas estratégias diferentes: a localização hsMob4A e B quando em fusão com epítomos conhecidos e para os quais existem anticorpos comerciais disponíveis, e a imunolocalização directa utilizando o soro de anti-Mob4.

4.3.1 Localização celular de proteínas de fusão hsMob4A e hsMob4B

As regiões codificantes de hsMob4A e hsMob4B foram clonadas em vectores de expressão em células de mamíferos, que possibilitam a produção de proteínas de fusão com os péptidos V5 (Invitrogen) e Myc (Invitrogen) e com as proteínas EYFP (Clontech) e RFP.

De modo a localizar intracelularmente a proteína Mob4, analisaram-se células a expressar transientemente a proteína hsMob4A em fusão com a proteína RFP. No decurso das experiências, verificou-se que a proteína RFP, quando expressa em células HeLa, forma inúmeros agregados, que em alguns casos chegam a provocar a lise das células. Sabe-se hoje que efectivamente a RFP tem a tendência de formar agregados em células de mamíferos e de bactérias, e que podendo resultar na lise das mesmas. A análise ficou assim limitada à observação de células com um nível muito baixo de expressão. Nestas, a proteína RFP.hsMob4A é frequentemente observada em co-localização com os centrossomas.

Em células 3T3, a expressão induzida pelo promotor CMV é mais fraca e, 18h após a transfecção das células, não se observam ainda muitos agregados. A imunofluorescência em células 3T3 foi realizada utilizando anticorpo anti- γ -tubulina como marcador centrossomal.

Na figura 4.5 não se observa qualquer acumulação de RFP na região dos centrossomas (indicados por uma seta verde). Não obstante, é possível observar agregados de RFP no citoplasma (painel F). A análise da figura 4.6 indica que a proteína hsMob4A se acumula nos centrossomas em interfase (painel B) e em metafase (painéis F/F'). Estes dois

painéis apresentam planos diferentes de uma mesma célula em metafase, a expressar RFP.hsMob4A, na qual se observa uma acumulação da proteína de fusão RFP.hsMob4A (setas vermelhas) nos polos do fuso (setas verdes).

Os resultados obtidos com a proteína de fusão RFP.hsMob4A sugerem que, tanto em células HeLa como em células 3T3, a hsMob4A é uma proteína centrossomal.

Com a finalidade de se confirmarem estes resultados, as proteínas hsMob4A e hsMob4B foram ambas expressas em fusão com YFP. Os clones que codificam para as proteínas de fusão YFP.hsMob4A e YFP.hsMob4B são designados de dCF41 e dCF37, respectivamente (ver apêndice 3).

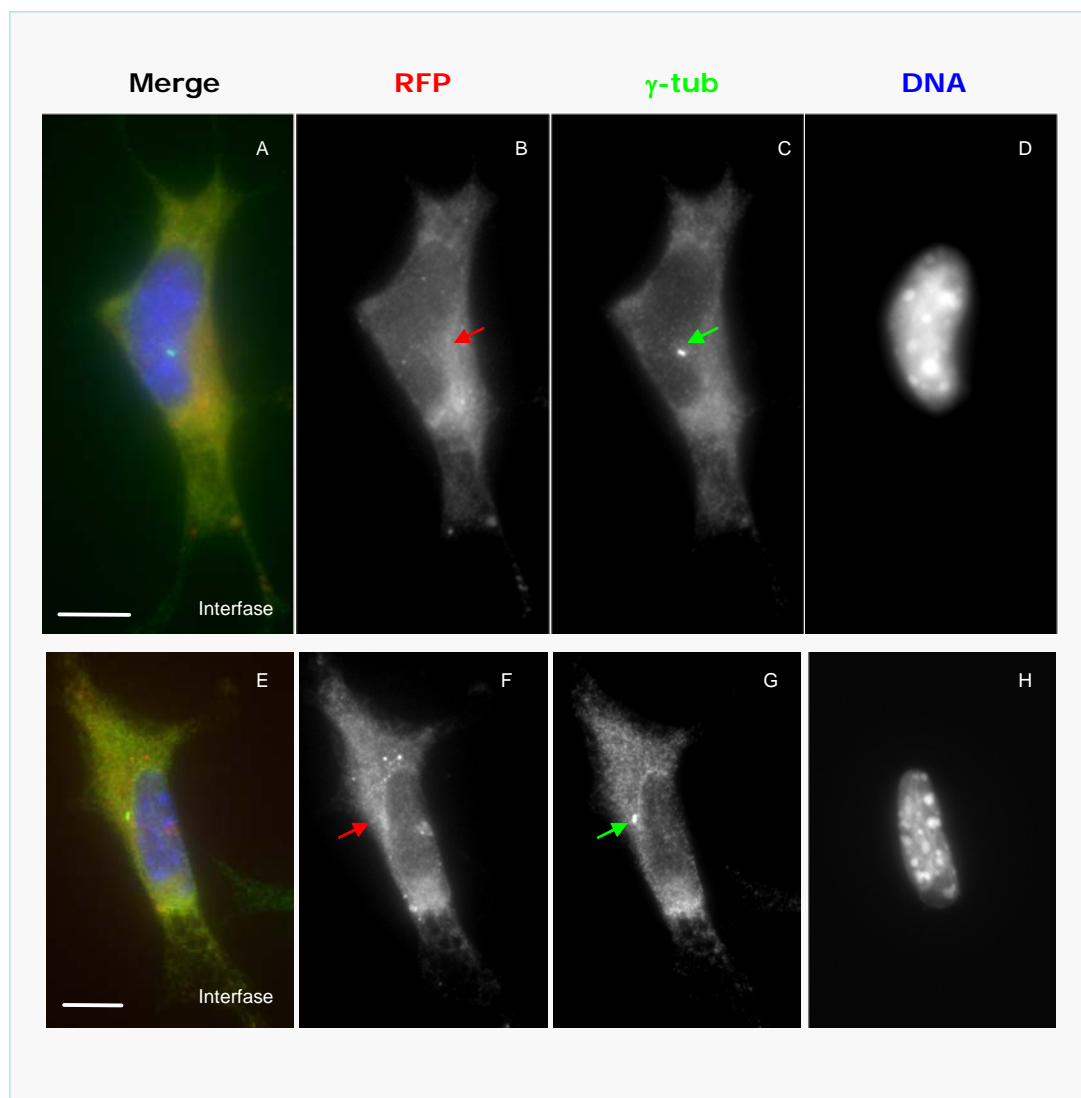


Figura 4.5 - Localização de RFP em células 3T3. A vermelho apresenta-se a RFP, a verde a γ -tubulina e a azul o DNA. Painel representativo de células swiss 3T3 transfectadas com RFP. A seta a verde indica o centrosoma. Barra de escala - 10 μ m.

Nestas experiências, observou-se que a YFP é uma proteína que se distribui entre o citoplasma e o núcleo em interfase (40% no primeiro e 60% no segundo). A YFP não tem nenhuma localização específica durante as prometáfase, metafase e anáfase. No entanto, é de referir que algumas células em telófase podem apresentar uma ligeira acumulação da YFP no midbody (Figura 4.7).

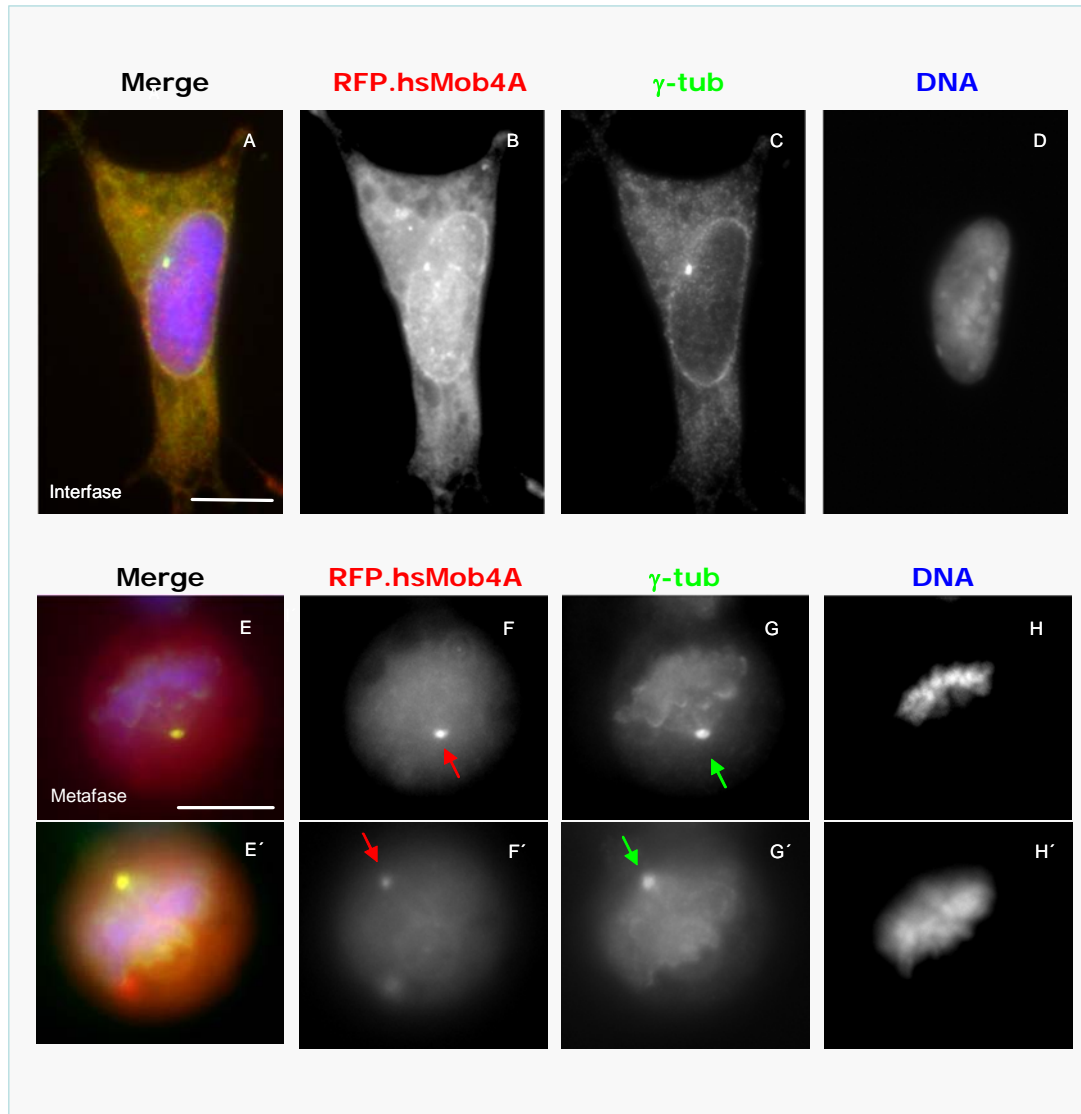


Figura 4.6 – Localização de RFP-hsMob4A em células 3T3. As setas indicam a posição do centrosoma. A barra de escala representa 10 μm .

Os ensaios realizados com a YFP.hsMob4A e a YFP.hsMob4B em células HeLa não indicaram diferenças de localização óbvia entre estas duas proteínas (figura 4.8 e 4.9).

Em interfase, ambas parecem acumular-se no núcleo e, em um ou dois pontos discretos perto do núcleo, que poderão corresponder aos centrosomas. Em metafase, ambas se acumulam nos polos do fuso, e em telófase observa-se uma co-localização com o midbody.

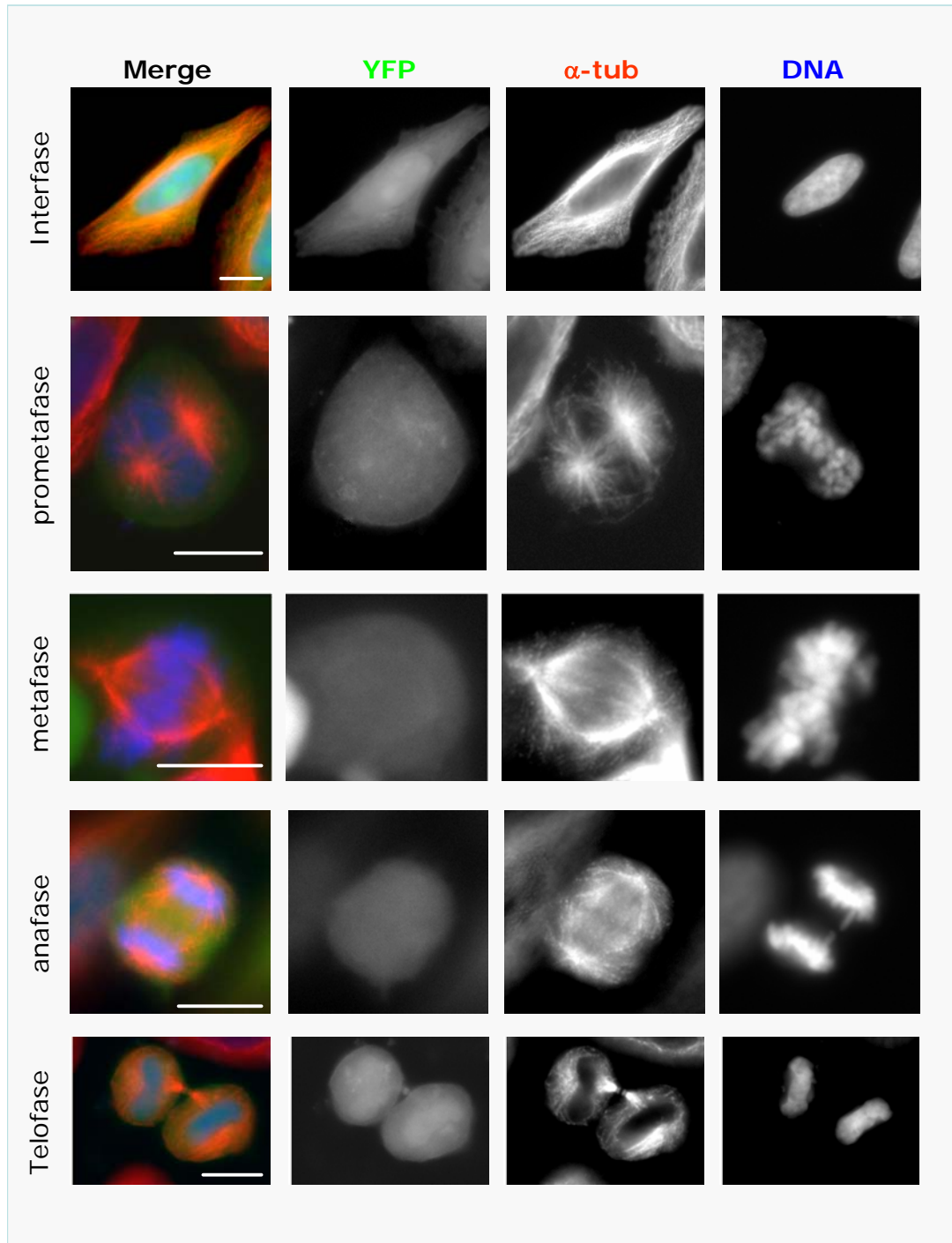


Figura 4.7 – *Localização de EYFP em células HeLa.* A verde apresenta-se EYFP, a vermelho α -tubulina e a azul o DNA. Como se pode observar, a proteína EYFP não parece ter uma localização específica em células HeLa. (A barra de escala representa 10 μ m)

A localização no midbody pode ser discutível, visto que o controlo YFP também apresenta alguma marcação neste local. No entanto, essa marcação deve ser específica por duas razões: as proteínas de fusão EYFP.hsMob4A e EYFP.hsMob4B localizam-se sempre no midbody, ao passo que a localização de EYFP no midbody nem sempre é observada.

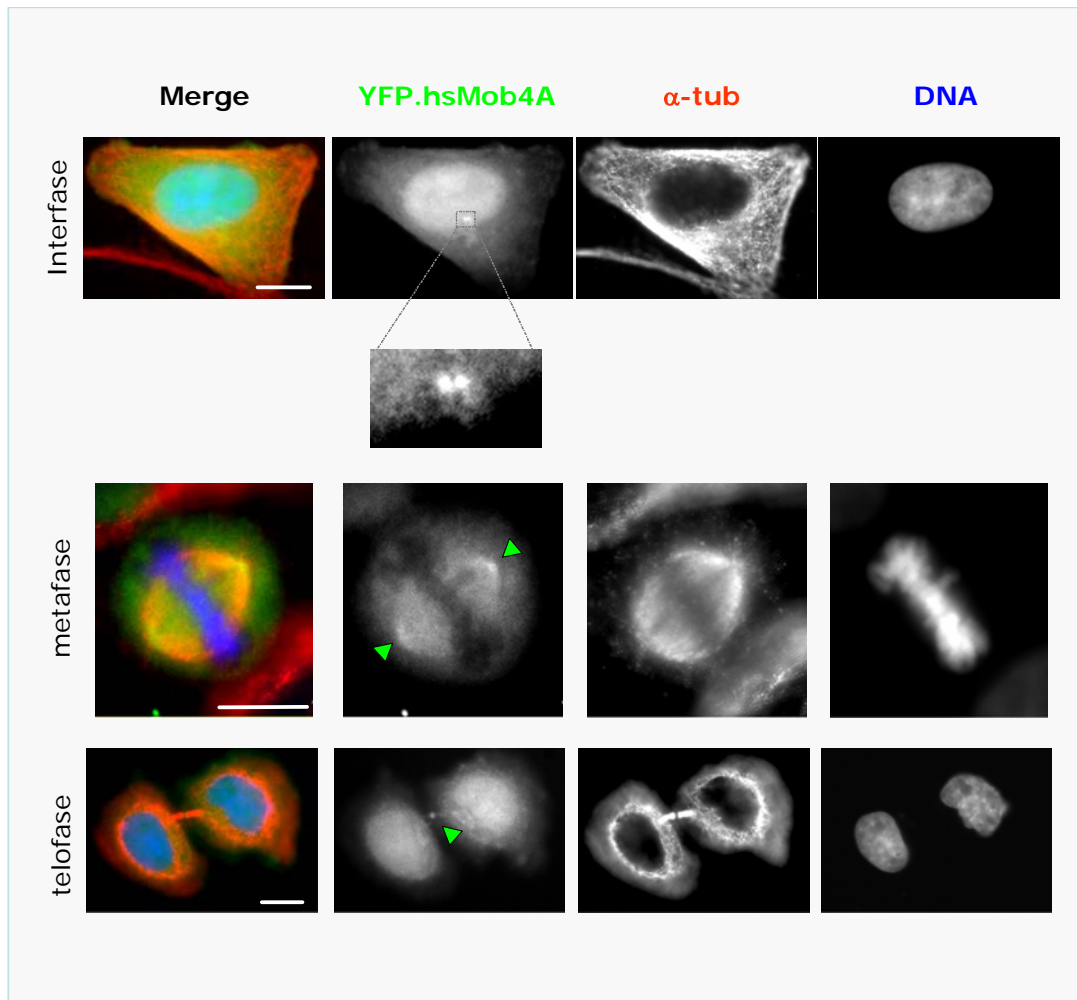


Figura 4.8 – *Localização da proteína de fusão EYFP.hsMob4A*. Transfectaram-se células HeLa com o clone dCF41 e analisou-se o resultado por imunofluorescência. A verde apresentam-se as proteínas de fusão, a vermelho α -tubulina e a azul o DNA. Localização de EYFP.hsMob4A em interfase, metáfase e telófase. (A barra de escala representa 10 μ m)

Além disso, nas experiências de imunolocalização das hsMob4A e hsMob4B em fusão com V5 e Myc, esta marcação no midbody é mantida, ao passo que as células controlo não marcam o midbody.

As imunolocalizações indirectas das proteínas de fusão hsMob4A.V5, hsMob4B.V5, hsMob4A.Myc e hsMob4B.Myc, permitiram verificar também que a hsMob4A e a hsMob4B são proteínas centrossomais.

Os resultados obtidos não permitem portanto, distinguir localizações diferentes entre hsMob4A e hsMob4B, o que pode indicar que hsMob4A e hsMob4B têm efectivamente a mesma localização celular. No entanto, é de referir que estes estudos foram realizados por sobreexpressão das proteínas, e que uma localização diferencial (se existe) das hsMob4A e B pode ser mascarada. É também de não esquecer que as hsMob4A e B estão a ser

produzidas como proteínas de fusão, podendo mascarar as diferenças estruturais existentes entre ambas e, conseqüentemente, as possíveis diferenças de localização existentes.

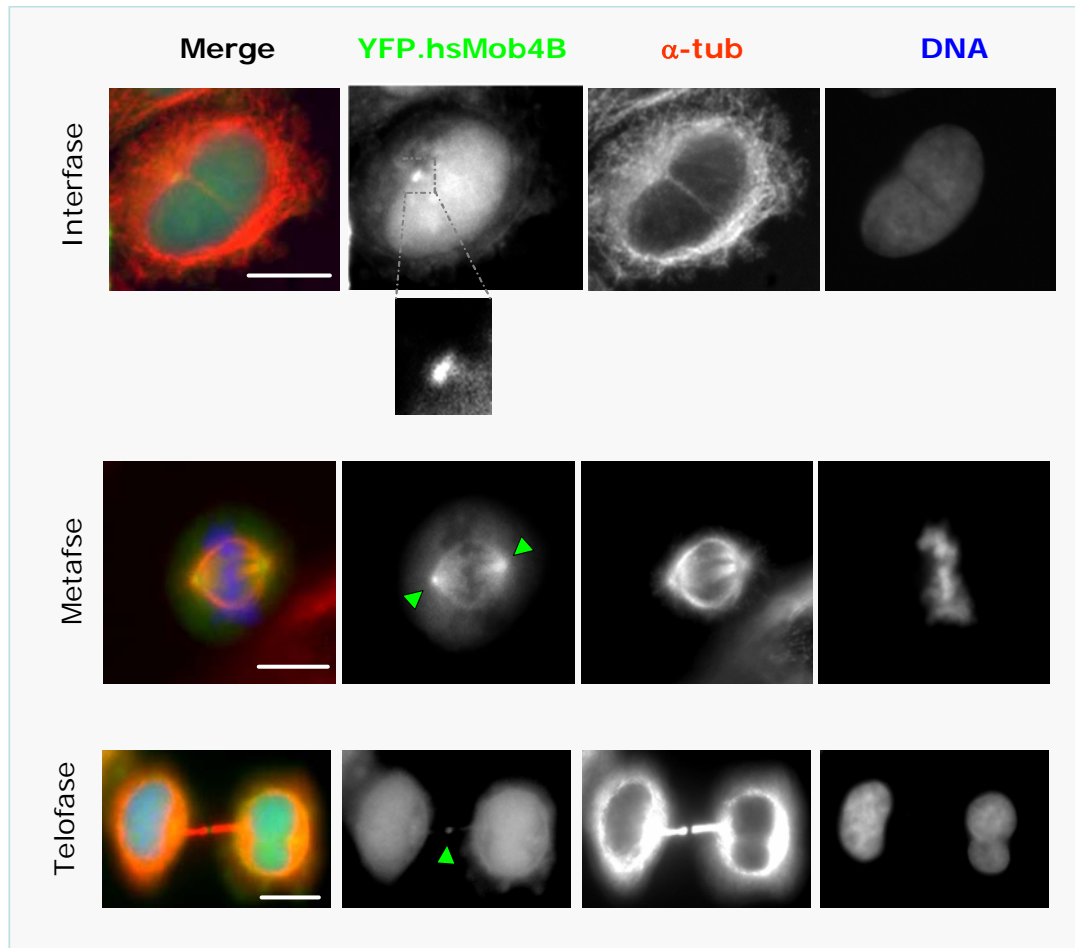


Figura 4.9 – *Localização da proteína de fusão YFP.hsMob4B.* Em células HeLa transfectadas com o clone dCF37 analisou-se a localização da proteína YFP-hsMob4B. A verde apresenta-se a proteína de fusão, a vermelho α -tubulina e a azul o DNA. A proteína acumula-se nos polos do fuso e no midbody em metafase e telofase, respectivamente (cabeças de seta). A barra de escala representa 10 μ m.

4.3.2 Imunolocalização intracelular de hsMob4

A determinação da localização celular da hsMob4 endógena, foi ainda realizada por imunofluorescência, utilizando-se o soro de anti-Mob4.

Como observado na figura 4.10, a hsMob4 parece ser um componente dos centrossomas durante a mitose pois, em profase, metafase e anafase a hsMob4(A&B) (painéis B, F e J) co-localiza com a γ -tubulina (painéis C, G e L).

Em telofase é possível observar a localização da hsMob4 no midbody e, surpreendentemente, só num dos centríolos do centrossoma (figura 4.11-A). Comparando os painéis A e B, observa-se que no painel B é possível distinguir os dois centríolos

(revelados pela marcação com a γ -tubulina - setas verdes), enquanto que no painel A detecta-se que a hsMob4 localiza-se em apenas um dos centríolos (setas verdes). Esta marcação foi confirmada através da análise de todos os planos das células. Tal marcação centriolar assimétrica foi também observada em células no final da mitose, ligadas apenas por uma ponte intracelular (seta azul), e em que o DNA já se encontra completamente descondensado (figura 4.11A). No entanto, em todas as células observadas e que estão já separadas (não se detectavam pontes intercelulares) a hsMob4 co-localiza novamente com os dois centríolos/centrossomas (figura 4.11 B, setas verdes). É de referir que devem ser os dois centríolos e não dois centrossomas que se observam na figura 4.11 A), uma vez que nesta fase do ciclo celular ainda não aconteceu nem a duplicação do DNA nem a duplicação dos centrossomas.

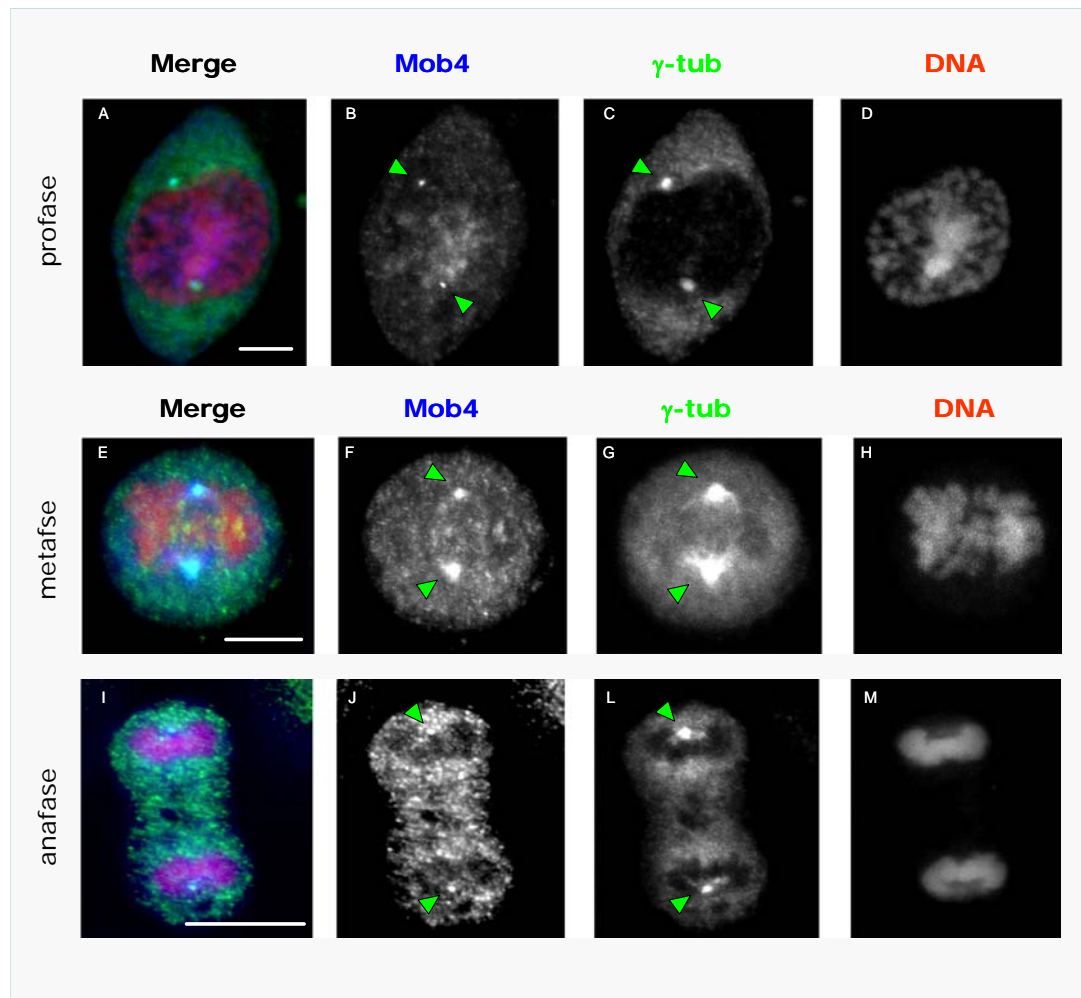


Figura 4.10 – Localização de *hsMob4* durante a mitose em células *HeLa*. Painéis representativos de profase, metafase e anafase. As setas indicam, a co-localização de *hsMob4* com a γ -tubulina (nos centrossomas). A barra de escala representa 10 μ m.

Estes resultados, extremamente interessantes, coincidem com os simultaneamente publicados do Dr Michel Bornens e colaboradores. Estes investigadores observaram que

após a mitose, as células de mamífero ficam muito tempo ligadas antes de executarem a citocinese (entre 1,5 horas a 5 horas no máximo) (Piel *et al.* 2001). Durante este tempo o centríolo filho tem um movimento errático nas células, enquanto que o centríolo mãe está

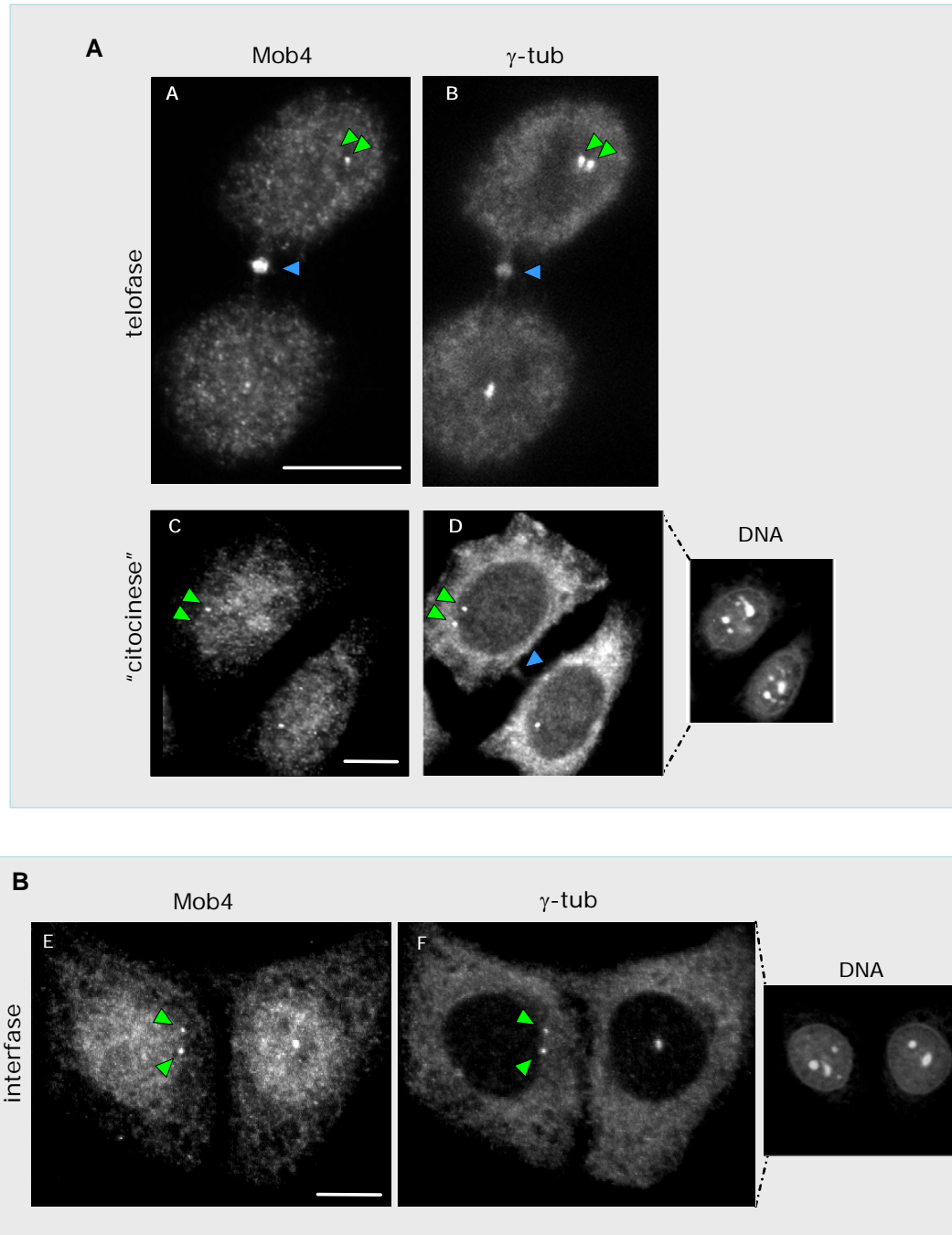


Figura 4.11 – Localização de hsMob4 em telofase e início de interfase. A) Localização de hsMob4 em telofase e em “citocinese”. As setas verde indicam os centrossomas/centríolos. Ambos os centríolos são marcados com a γ -tubulina mas a hsMob4 é detectada em apenas um dos centríolos. Estas células ainda não executaram citocinese (midbody e ligação intracelular indicada pela seta azul). **B)** hsMob4 em interfase. A barra de escala representa 10 μ m.

mais ou menos estático próximo do núcleo (Piel *et al.* 2000). No entanto, imediatamente antes da citocinese, o centríolo mãe desloca-se até ao midbody e volta para o centro da célula. Quando o movimento de volta para o centro da célula se inicia, as células executam a citocinese (Piel *et al.* 2001). Parece assim, que o centríolo mãe é responsável por sinalizar a execução da citocinese (Figura 4-12).

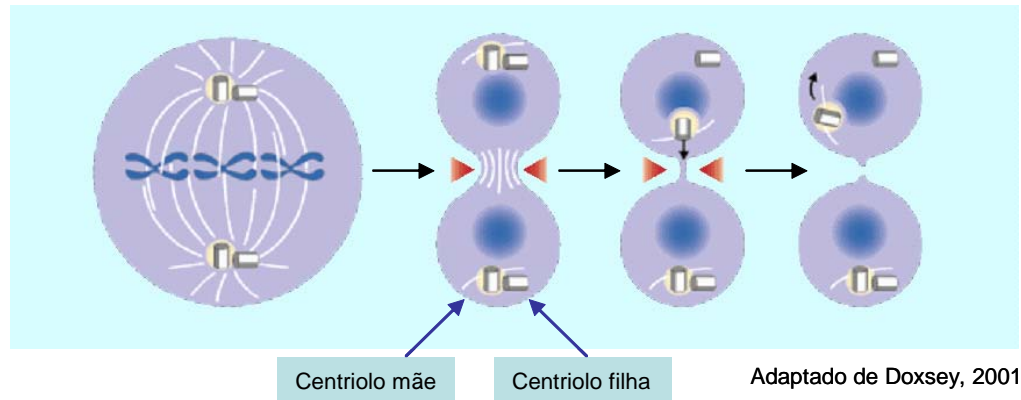


Figura 4.12 – Modelo da indução de citocinese provocada pelo centríolo mãe em células de mamíferos. (Dados originais de Piel *et al.*, 2001, Adaptado de Doxsey, 2001).

A questão que se coloca então é: a qual dos centríolos se liga a hsMob4? Para se responder a essa questão utilizaram-se as células HeLa-centrina⁴, cedidas pelo Dr Michel Bornens. Como descrito pelo grupo do Dr Bornens, esta linha celular permite distinguir entre o centríolo mãe e o centríolo filho, pois o centríolo mãe tem uma maior acumulação de centrina do que o centríolo filho (em G1/S, S e mitose). Em G2 as diferenças de acumulação de centrina não são muito significativas (Piel *et al.* 2000). Fez-se imunofluorescência de hsMob4 em células HeLa-centrina e, como apresentado na figura 4.13, a hsMob4 parece estabelecer uma ligação entre os dois centríolos. Nos painéis 1, 2, 3 e 4 da figura 4.13 apresenta-se uma sequência de fotografias da duplicação e separação dos centrossomas, observando-se que durante estes dois processos, a hsMob4 se localiza entre os dois centríolos de cada centrossoma.

Durante a mitose (figura 4.14 A, metafase e anafase), hsMob4 continua a localizar-se nos centrossomas entre os centríolos e, durante a telofase tardia/citocinese, a proteína hsMob4 é detectada no midbody e num só centríolo (figura 4.14 B). Uma vez que se trata do centríolo que está mais próximo do midbody e o mais brilhante, de acordo com o descrito por Piel *et al.* (2001), será o centríolo mãe. É importante referir que o soro anti-Mob4 também apresenta alguma marcação nuclear em interfase, assim como sobre os cromossomas durante a mitose.

⁴ As células HeLa-centrina são células que têm inserida no seu genoma a sequência que codifica para a proteína de fusão centrinaGFP. A centrina é uma proteína que se localiza na extremidade

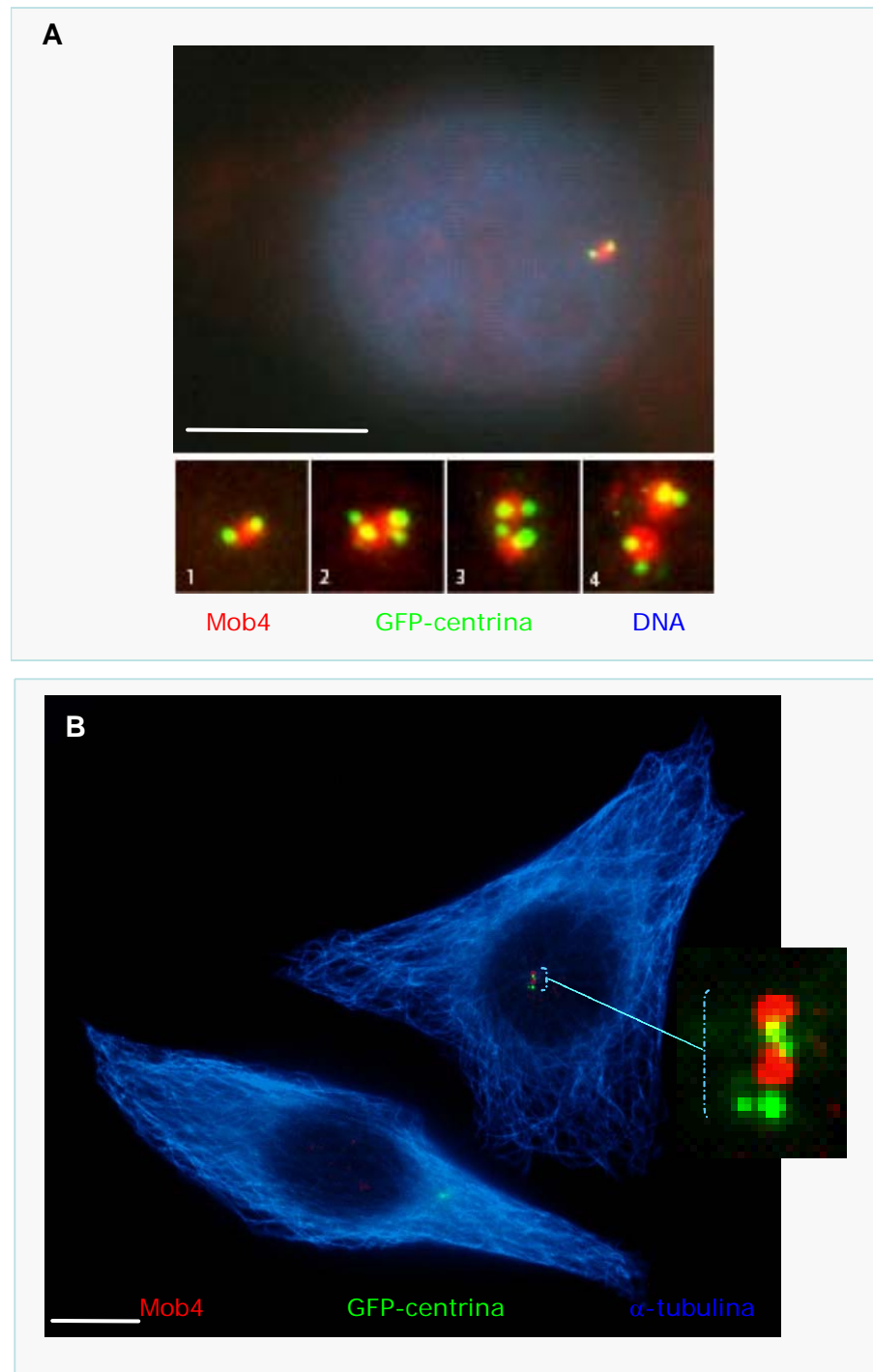


Figura 4.13 – Localização de hsMob4 em células *HeLa* centrina. A vermelho apresenta-se Mob4, a verde os centríolos e a azul o DNA. **A)** localização de hsMob4 entre os dois centríolos em interfase. **Painéis 1-4**, fotografias da duplicação e separação dos centrosomas. A hsMob4 continua a observar-se entre os centríolos. **B)** Em células em interfase hsMob4 detecta-se “entre” os dois centríolos.

Por imunodepleção confirmou-se a validade das imunofluorescências, e que hsMob4 é um verdadeiro constituinte do centrossoma já que, mesmo após a despolimerização dos microtúbulos com nocodazole, continua a observar-se uma co-localização de hsMob4 com a γ -tubulina (estes resultados de imunodepleção e de confirmação da Mob4 como um verdadeiro constituinte do centrossoma foram obtidos por Joana Perdigão).

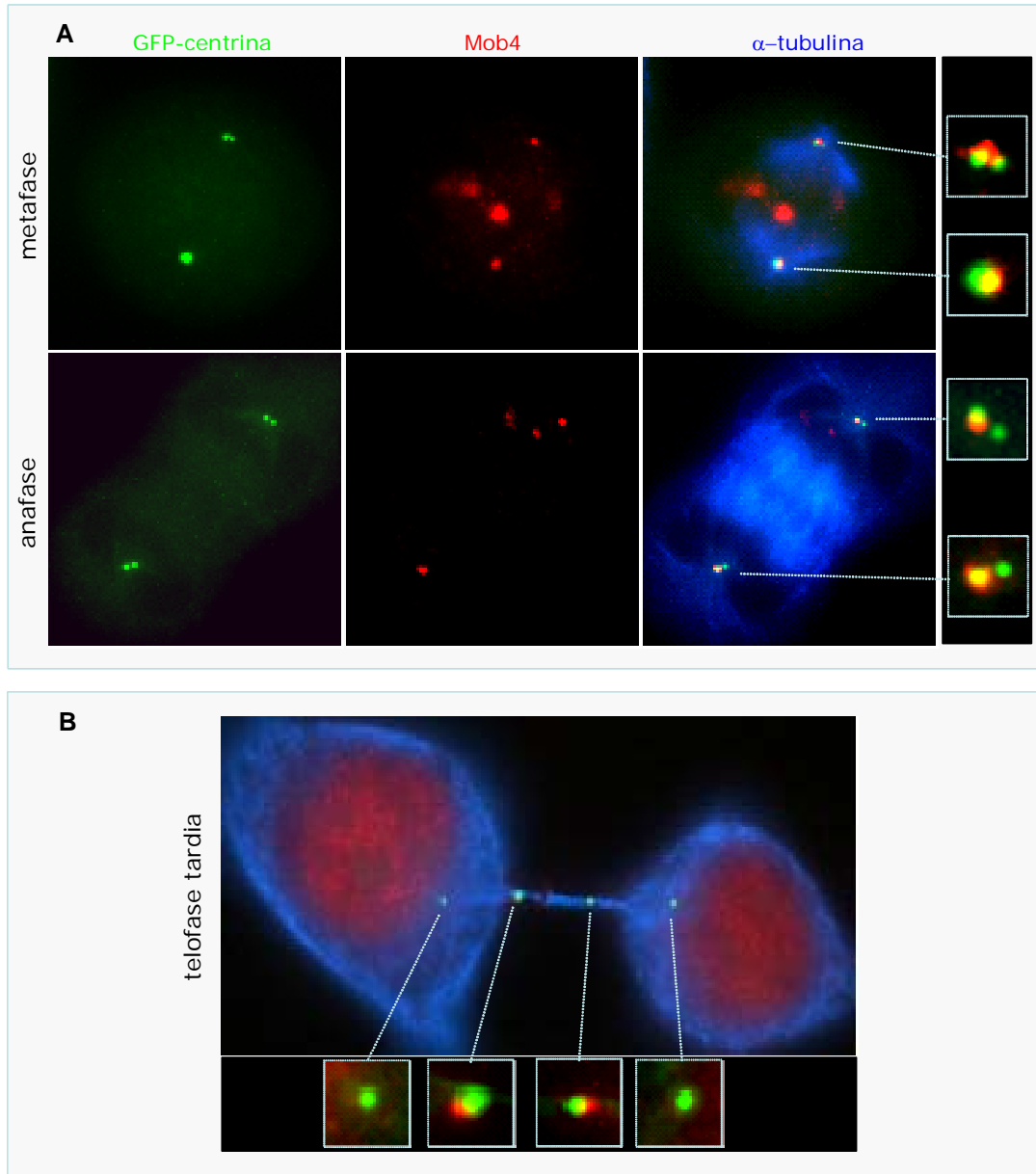


Figura 4.14 – Localização de hsMob4 em células HeLa centrina, durante a metafase, anafase (**A**) e telofase tardia (**B**). A vermelho observa-se hsMob4, a verde centrina e a azul α -tubulina. A hsMob4 acumula-se “entre” os dois centriolos em meta e anafase. Em telofase a Mob4 é detectada num só centríolo, que é o que se move para o midbody, antes de citocinese. (Fotos de Joana Perdigão)

4.4 Discussão

Os resultados obtidos neste capítulo com as proteínas de fusão, assim como os resultados de imunofluorescência, sugerem que hsMob4 se acumula nos centrossomas e no midbody; os resultados obtidos por imunofluorescência permitem ainda concluir que no final da telofase, e imediatamente antes de citocinese, a hsMob4 se acumula apenas no centríolo mãe.

Na figura 4.15 é apresentado um modelo possível para a localização de hsMob4 nos centrossomas durante o ciclo celular: a hsMob4 acumula-se entre os centríolos durante todo o ciclo celular, excepto em telofase, quando os centríolos se separam. Durante esta fase, a hsMob4 mantém-se associada apenas ao centríolo mãe até que ocorra citocinese, voltando então a acumular-se nos dois centríolos.

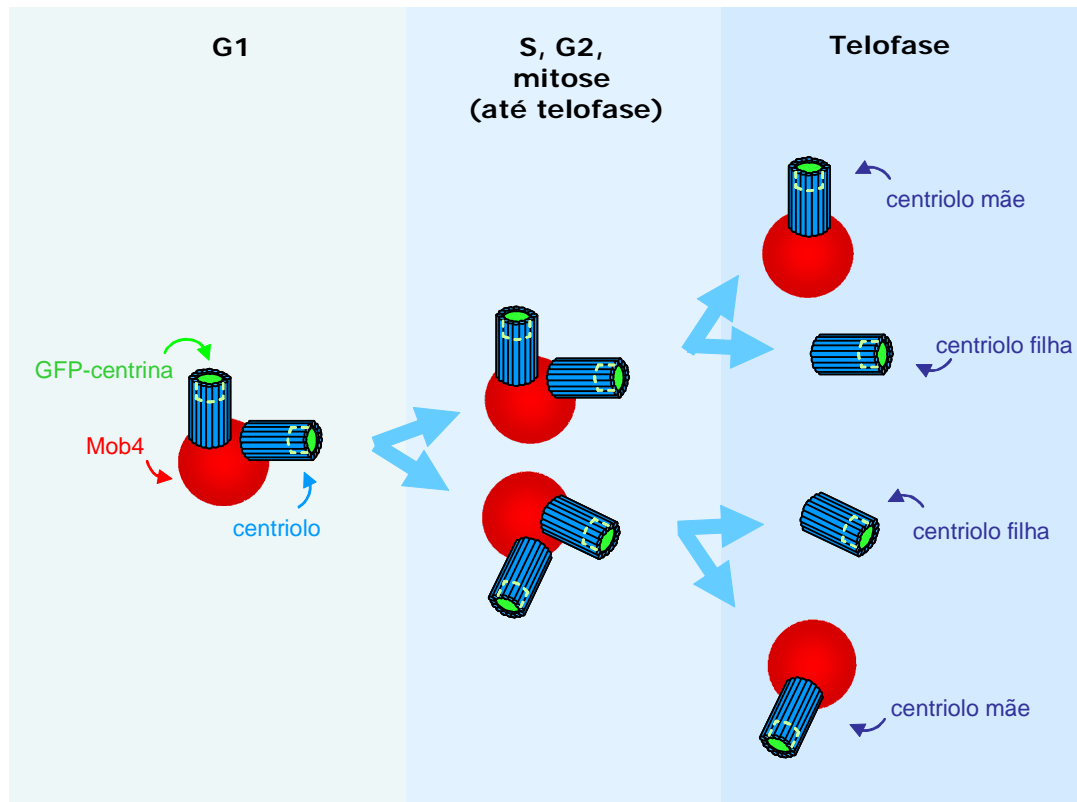


Figura 4.15 – Modelo para localização de hsMob4 nos centrossomas.

Até muito recentemente, os centrossomas foram considerados como organizadores de microtúbulos indispensáveis à formação do fuso mitótico, sendo essa a sua principal função na célula. No entanto essa característica de ser essencial para a formação do fuso mitótico tem vindo a ser questionada por diversos investigadores. Rebeca Heald e colaboradores (1996) mostraram que, num extracto acentrossomal de oócitos de *Xenopus*,

grãos de agarose cobertos com DNA poderiam "dirigir e promover a formação de um fuso bipolar", tornando-se os centrossomas dispensáveis.

Numa abordagem completamente diferente, Conly Rieder e os seus colaboradores (Khodjakov *et al.* 2000) observaram que, após a destruição (com um laser) dos centrossomas numa célula de mamíferos em prometáfase, esta conseguia executar a mitose, formando um fuso bipolar normal com a capacidade de segregar os cromossomas.

Existirão então outras funções para os centrossomas para além de participarem na formação do fuso mitótico? E qual o destino de células acentrossomais? O Dr Rieder apresentou um outro estudo onde demonstrava que as células acentrossomais têm problemas em assegurar a fidelidade da citocinese, pois 50% das células CVG-2 (fibroblastos de macaco verde) em que foram destruídos a laser os centrossomas, falham a citocinese e não conseguem iniciar o ciclo celular seguinte (parando antes de se iniciar a replicação do DNA) (Khodjakov & Rieder, 2001). A hipótese de que há sinais provenientes dos polos do fuso que controlam e promovem a citocinese é já antiga, tendo sido inicialmente proposta por Rappaport na sequência dos resultados obtidos pelas suas experiências em ovos de invertebrados marítimos. Rappaport introduziu uma esfera de vidro no meio da célula, fazendo com que esta adoptasse a forma de um anel. Na primeira divisão a célula executou a citocinese entre os dois centrossomas ficando com a forma de ferradura; na segunda divisão a célula dividiu-se entre os dois centrossomas na região onde estava o DNA e, após essa divisão, os microtúbulos astrais da célula binucleada aproximaram-se e criaram um sulco de clivagem ectópico onde ocorreu uma segunda divisão. Este sulco de clivagem extra, apesar de se iniciar mais tarde, consegue levar a cabo a citocinese onde não existia nem um fuso nem cromossomas (apenas proximidade entre os microtúbulos astrais). Mais recentemente observou-se que, em células de mamífero a citocinese é promovida pelo movimento do centríolo mãe até ao midbody e de volta para o centro da célula (Piel *et al.* 2001). Todas estas experiências favorecem a hipótese que os centrossomas possam estar associados a um mecanismo regulatório de controle da citocinese, e as experiências realizadas pelo grupo de Michel Bornens sugerem mais especificamente que esse mecanismo é dependente do centríolo mãe, mas as bases moleculares desse mecanismo permanecem ainda desconhecidas.

Até muito recentemente não estava descrita nenhuma proteína que se localizasse apenas no centríolo mãe durante telófase. No entanto, em Maio de 2003, o grupo de S. Doxsey descreveu uma nova proteína, a centriolina que, tal como Mob4, se localiza no centríolo mãe em telófase, e nos centrossomas durante as reastantes fases do ciclo (Gromley *et al.* 2003). A centriolina é uma proteína que estruturalmente, tem alguma

conservação com um componente da MEN de *S.cerevisiae*, a proteína Nud1⁵. O grupo do Dr Doxsey verificou que a centriolina é um componente de um mecanismo que regula a citocinese em eucariotas superiores, pois células de mamíferos sem centriolina apresentam vários defeitos característicos de falhas em citocinese (permanecem ligadas muito tempo por pontes intercelulares longas sem conseguirem executar a separação física final entre as duas células filhas).

Em resumo, sabe-se que scMob1 e spMob1, proteínas do SPB, estão envolvidas na promoção da citocinese e da saída de mitose em *S.cerevisiae* e *S. pombe*, respectivamente. Também em células eucariotas, os centrossomas parecem ter associado ao centríolo mãe um mecanismo regulatório da citocinese, cujas bases moleculares são ainda desconhecidas. Os resultados apresentados neste capítulo indicam que as hsMob4 são proteínas estáveis e que se localizam no centrossomas, onde parecem fazer uma ligação entre os dois centríolos, durante quase todo o ciclo celular (para se ter a certeza que Mob4 é um elo de ligação entre os centríolos, seria necessário recorrer à técnica de microscopia electrónica). A excepção ocorre durante a telofase, quando os centríolos se separam, e na qual as hsMob4 são detectadas apenas associadas ao centríolo mãe. Essa associação ao centríolo mãe, em conjunto com os dados dos mutantes de leveduras, são altamente sugestivas de uma possível função associada à citocinese.

⁵ Nud1 é um componente da MEN-mitotic exit network, que é cascata de sinalização que controla a saída de mitose em *S.cerevisiae*, sendo Nud1 o esqueleto estrutural onde alguns dos componentes dessa cascata de sinalização estão ancorados (Gruneberg et al 2000).

5. Ensaios de RNAi duplo

O objectivo dos estudos apresentados neste capítulo foi identificar qual a função de hsMob4(A&B) na célula. Decidiu-se utilizar a técnica de RNAi e efectuar a deplecção de hsMob4A e hsMob4B simultaneamente, pois a enorme semelhança que existe entre ambas as proteínas (96% de identidade) sugeria uma possível redundância de funções. A deplecção simultânea de hsMob4A e de hsMob4B será designada de deplecção de hsMob4(A&B).

5.1 Silenciamento induzido pelo RNAi

Os oligos que se vão apresentar neste trabalho designam-se de Oli1 (desenhado contra hsMob4A), Oli2 (desenhado contra hsMob4B), Oli3 (desenhado contra a LâminaA/C), e ainda *scramble duplex* (que tem uma sequência que não existe no genoma humano). Como as células foram sempre transfectadas com duplex dos oligos, os duplexes que se utilizaram nas experiências serão designados de duplex Oli1, duplex Oli2, e duplex Oli3 respectivamente. O objectivo da utilização dos duplexes Oli3 e do *scramble duplex* foi o seguinte:

- Duplex Oli3 – Oligo descrito no artigo Elbashir *et al.* 2001, que actua contra a proteína do envelope nuclear Lâmina A/C, este foi utilizado como controlo positivo da experiência. Permitiu ainda verificar (por imunofluorescência) que os efeitos causados pela deplecção de hsMob4(A&B) não se observavam aquando da deplecção da Lâmina A/C.
- scramble duplex- Oligo de siRNA cuja sequência não existe no genoma humano, que pode ser utilizado como controlo negativo da experiência.

Apesar das proteínas hsMob4A e hsMob4B possuírem um elevado grau de homologia, ao nível de cDNA as sequências divergem frequentemente no 3º codão, e não há uma única sequência de 21 nucleotídeos seguidos que sejam exactamente iguais entre si. Por esta razão, decidiu-se desenhar oligos específicos para cada uma das hsMobs4, escolhidos de acordo com as indicações da Dharmachon e do artigo Elbashir *et al.* 2001.

Os oligos desenhados para a hsMob4A e para a hsMob4B têm início respectivamente 90 e 532 pares de bases após o ATG inicial de cada um dos cDNAs. Fez-se uma pesquisa na bases de dados dos ESTs do genoma humano com as sequências escolhidas, para confirmar que não existem sequências homólogas noutros genes. De notar que a sequência do oligo de hsMob4A difere 4 pares de bases da sequência de hsMob4B, e a sequência escolhida para hsMob4B também difere 4 pares de bases da sequência correspondente em hsMob4A (figura 5.1 A) e B)).

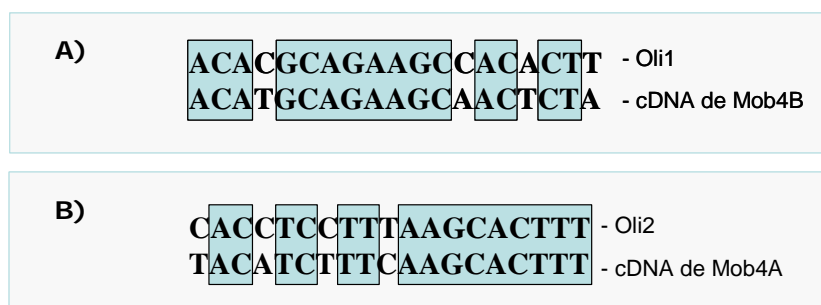


Figura 5.1 – Homologia entre as sequências dos cDNAs e dos oligos de *hMob4A* e *hsMob4B*. A azul indicam-se os nucleotídeos exactamente iguais nas duas sequências. **A)** Comparação entre o oligo de *hsMob4A* e a sequência correspondente no cDNA de *hsMob4B*. **B)** Comparação entre o oligo de *hsMob4B* e a sequência correspondente no cDNA de *hsMob4A*.

A questão inicial foi determinar se os oligos escolhidos seriam eficazes contra cada uma das proteínas alvo. Como referido no capítulo anterior, dispunha-se apenas de um anticorpo que reconhece ambas as proteínas tipo *hsMob4*, o que poderia dificultar a análise da eficiência do RNAi contra *hsMob4A* e *hsMob4B* especificamente.

Portanto, o primeiro teste feito foi o de co-transfectar células HeLa com o vector que codifica para a *hsMob4A* em fusão com YFP (dCF41), e com o duplex Oli1. Como controlo, transfectaram-se células com dCF41 e sem oligos, outras com o vector pEYFPC1 mais o duplex Oli1, e ainda com pEYFPC1 e com o duplex Oli3 (descrito em Elbashir *et al.* 2001) (tabela 5.1).

Como se pode observar na tabela 5.1), a co-transfecção com qualquer dos duplexes de oligos não afecta a expressão de YFP a partir do vector. Quando se co-transfectam as células com duplex Oli1 e com dCF41, verifica-se que o duplex Oli1 provoca uma redução significativa no número de células fluorescentes observadas desde o primeiro dia, e quase não se detectam células a expressar YFP.*hsMob4A* três dias após transfecção (tabela 5.1). No entanto, no caso de células co-transfectadas com pEYFPC1 e com o duplex Oli3 ou com o duplex Oli1, o número de células verdes não reduz e até aumenta (tabela 5.1). Estes resultados indicam que o duplex Oli1 é eficaz em provocar a redução dos níveis de YFP.*hsMob4A*. Do mesmo modo, experiências similares com o oligo Mob4B mostraram que este é eficaz contra a expressão da proteína YFP.*hsMob4B*. A co-transfecção de ambos os duplexes simultaneamente resultou na supressão de tanto YFP.*hsMob4A* como YFP.*hsMob4B*.

Com o intuito de confirmar estes resultados, realizou-se uma experiência diferente. Transfectaram-se as células com os duplexes de oligos, de modo a activar a maquinaria de RNAi, esperou-se 1 dia e transfectaram-se as células com os vectores que produzem as proteínas de fusão. Neste caso, verificou-se que as células transfectadas com os duplexes

	YFP	YFP.hsMob4A	YFP.hsMob4B
Duplex Oli1	+	-	+
Duplex Oli2	+	+	-
Duplex Oli3*	+	+	+
Duplex Oli1 & Duplex Oli2	+	-	-

+ indica a presença de YFP

- indica a ausência de YFP

* A eficácia do RNA contra a Lâmina A/C foi confirmada por Western Blot

Tabela 5.1 – Análise da eficiência dos oligos na indução da depleção das proteínas de fusão. Após transfecção, contaram-se durante seis dias as células fluorescentes (sempre na mesma zona da placa de cultura de células). Oli 1- oligo contra hsMob4A, Oli 2- oligo contra hsMob4B e Oli3 – oligo contra Lâmina A/C. As células foram co-transfectadas com os duplexes de siRNA e com os vectores que expressam as proteínas de fusão indicados.

Oli1 e Oli2 são incapazes de produzir respectivamente YFP.hsMob4A e YFP.hsMob4B, já que quase não se observam células fluorescentes (tabela 5.2); verificou-se também que as células co-transfectadas simultaneamente com os duplexes de siRNA Oli1 e Oli2, são capazes de silenciar a co-expressão de YFP.hsMob4A e YFP.hsMob4B (Tabela 5.2). Por outro lado, em experiências similares, o duplex Oli3 não afecta a produção de YFP.hsMob4B, o que sugere que os níveis de YFP.hsMob4B não diminuem devido à activação prévia e não dirigida da maquinaria de RNAi com o oligo contra a Lâmina A/C.

	Número de células fluorescentes
dCF41 + Duplex Oli1	0
dCF37 + Duplex Oli2	10
dCF41 & dCF37 + Duplex Oli1 & Oli2	15
pEYFPC1 + Duplex Oli3	116

Tabela 5.2 – Análise da eficiência dos oligos na indução da depleção das proteínas de fusão. Após a segunda transfecção, contaram-se-se durante seis dias as células fluorescentes. Oli 1- oligo contra hsMob4A, Oli 2- oligo contra hsMob4B e Oli3 – oligo contra Lam A/C. As células foram tratadas com oligos siRNA e, um dia após, foram transfectadas com os vectores que expressam YFP, YFP.hsMob4A e YFP.hsMob4B

Em resumo, podemos concluir que os oligos escolhidos são eficazes e específicos contra hsMob4A ou contra hsMob4B, e ainda que o RNAi duplo é capaz de induzir a depleção simultânea de hsMob4A e hsMob4B.

Estávamos então em condições de começar a testar a eficiência de depleção dos níveis de hsMob4(A&B) endógenos. O protocolo de transfecção com os diferentes oligos e

com diferentes confluências celulares foi otimizado utilizando um oligo fluorescente como controlo (ver materiais e métodos). Células HeLa-centrina foram tratadas com os duplexes Oli1 e Oli2 simultaneamente (contra hsMob4(A&B)), ou com duplex Oli3, recolhidas dois dias após a transfecção, e analisadas por Western Blot (figura 5.2). Como se pode observar na figura 5.2, os níveis de hsMob4(A&B) endógenos decrescem bastante (>95%) quando as células são transfectadas simultaneamente com os duplexes Oli1 e Oli2. Nas experiências controlo (duplex Oli3) não há alterações nos níveis de hsMob4(A&B) (endógeno), mas o duplex Oli3 foi eficaz causando a diminuição da Lâmina A/C, confirmando que a maquinaria de RNAi está funcional. A utilização simultânea dos duplexes Oli1 e Oli2 não tem efeitos nos níveis de lâmina, tal como esperado. Como controlo interno da quantidade de proteína existente em cada poço do gel determinaram-se os níveis de γ -tubulina e, como se pode observar ambos os poços têm aproximadamente a mesma quantidade de proteína.

Em conclusão, que a utilização simultânea dos duplexes Oli1 e Oli2 provoca a depleção específica de hsMob4 endógeno.

5.2 Depleção de hsMob4: análise em células fixas

Os efeitos da causados pela depleção de hsMob4(A&B), foram analisados por imunofluorescência em células HeLa-centrina tratadas simultaneamente com os duplexes Oli1 e Oli2. Como controlos utilizaram-se o duplex Oli3, o scramble duplex, e ainda células não transfectadas. A utilização de um controlo de células não transfectadas permitiu, por comparação com os outros dois controlos, concluir quais os efeitos da activação da maquinaria de RNAi.

Verificou-se dois dias após transfecção, que a depleção de hsMob4(A&B) não causa anormalidades mitóticas óbvias. O índice mitótico é semelhante aos controlos, o fuso mitótico forma-se normalmente e a segregação da cromatina parece normal. No entanto, os centríolos das células deplectadas de hsMob4(A&B) estavam frequentemente mais separados um do outro do que nas células controlo (figura 5.3 e 5.4). Uma separação de centríolos como a da célula C foi observada muito raramente no controlo, sendo comum no RNAi hsMob4(A&B); separações como na célula D nunca se observaram no controlo. Geralmente as células do controlo apresentavam os centríolos juntos (célula A) ou, menos frequentemente, ligeiramente separados (célula B).

Enquanto que nas células controlo os centríolos raramente se encontravam separados mais de 3 μ m ($4,6 \pm 1,5$ das células transfectadas com os oligos *scramble duplex*) em células deplectadas de Mob4 esta percentagem é de $26,8 \pm 4\%$. Estes números resultam da contagem de 500 células em cada uma das três experiências independentes. O número de células com centríolos separados após a depleção de hsMob4(A&B) será

provavelmente maior, pois a eficiência de transfecção não é 100% e nem todas as células transfectadas têm os níveis da proteína hsMob4 reduzido a zero; logo, algumas das células contadas serão na realidade selvagens ou próximo. De notar que o tratamento de células com oligos não dirigidos contra hsMob4 (*scramble duplex* ou contra a Lâmina) não tem efeito sobre a separação dos centríolos (comparar com o valor obtido para células não transfectadas). Este resultado elimina a por si possibilidade do fenótipo observado ser um artefacto da técnica de RNAi.

Após o tratamento com oligos contra Mob4, não só o número de células com centríolos separados aumenta, como a distância que separa os dois centríolos parece ser superior à distância observada nas células controlo. Mediu-se então a distância entre os centríolos nestas células. Para tal, utilizaram-se 40 fotografias de cada uma das 3 experiências independentes e mediu-se a distância entre os centríolos de todas as células em cada foto, e que estavam em interfase com apenas dois centríolos. Determinou-se assim que a distância média que separava os centríolos aumentou de $1,44 \pm 0,2 \mu\text{m}$ nas controlo para $3,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$ nas células sem Mob4. A distância observada nas células controlo está de acordo com Chevrier *et al.* 2002. Observou-se assim um aumento médio de 2,54 vezes na distância que separa os dois centríolos¹.

Com o objectivo de apresentar uma noção mais correcta das diferenças observadas nas distâncias que separam os centríolos, agruparam-se as células em grupos de acordo com as distâncias médias em intervalos de separação dos centríolos (figura 5.5). Mais de 50% das células controlo (68,9%) tem uma distância de separação entre os centríolos menor que $1 \mu\text{m}$, enquanto que a maioria das células deplectadas em hsMob4 apresenta uma distância entre os centríolos superior a $1 \mu\text{m}$ (59,8%), sendo que 41,6% destas têm mesmo uma separação dos centríolos superior a $2 \mu\text{m}$. Enquanto que a maior separação entre os centríolos observada nos controlos foi de $16,2 \mu\text{m}$, no RNAi de hsMob4(A&B) foi de $44,63 \mu\text{m}$. É significativo que 9,4% das células deplectadas em hsMob4(A&B) tenham uma distância entre os centríolos superior a $10 \mu\text{m}$, enquanto tal só se observou em 1% nas células controlo. Existe a possibilidade de que nas células controlo, apesar de poder haver alguma separação dos centríolos, esta está restringida a um limite. Na ausência de hsMob4(A&B), essa coesão parece desaparecer e os centríolos afastam-se a distâncias muito superiores.

¹ Analisamos 620 células para o controlo e 690 para o RNAi de hsMob4(A&B) respectivamente

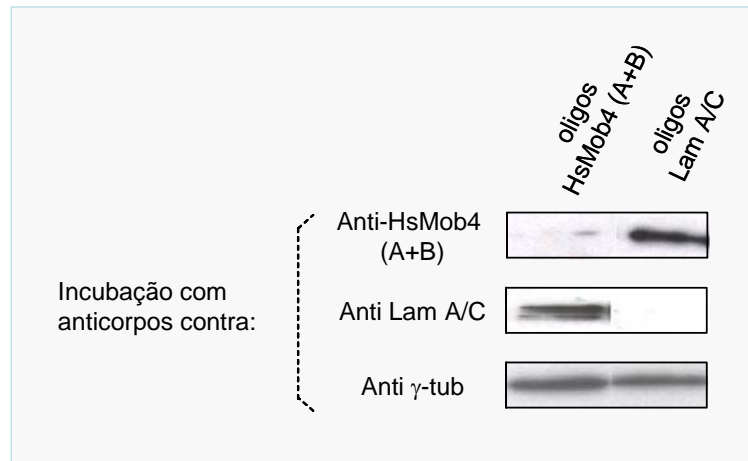


Figura 5.2 – Depleção dos níveis endógenos de hsMob4(A&B) após RNAi. Western Blot das células transfectadas com oligos contra a Lâmina A/C e contra hsMob4(A&B).

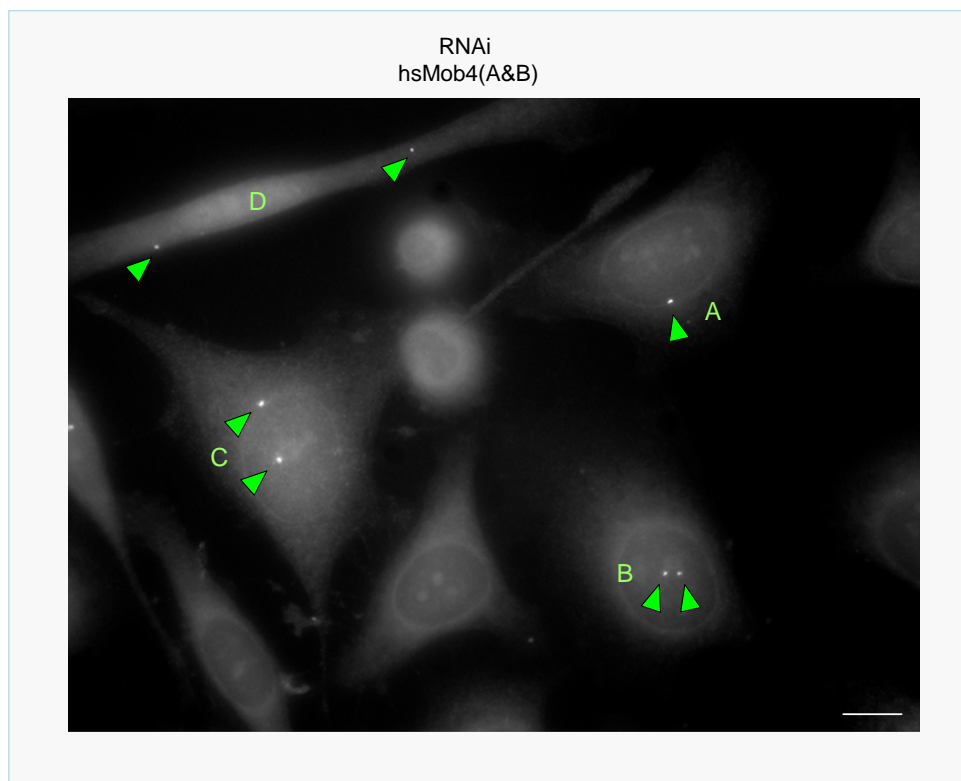


Figura 5.3 – Foto representativa das distâncias de separação de centríolos observadas após RNAi. No painel apenas se detecta a centrina-GFP (centríolos). As setas indicam os centríolos. (A e B - separação normal em células controle, C e D – distâncias raramente observadas no controle mas comuns após RNAi de Mob4). A barra de escala representa 10 μ m.

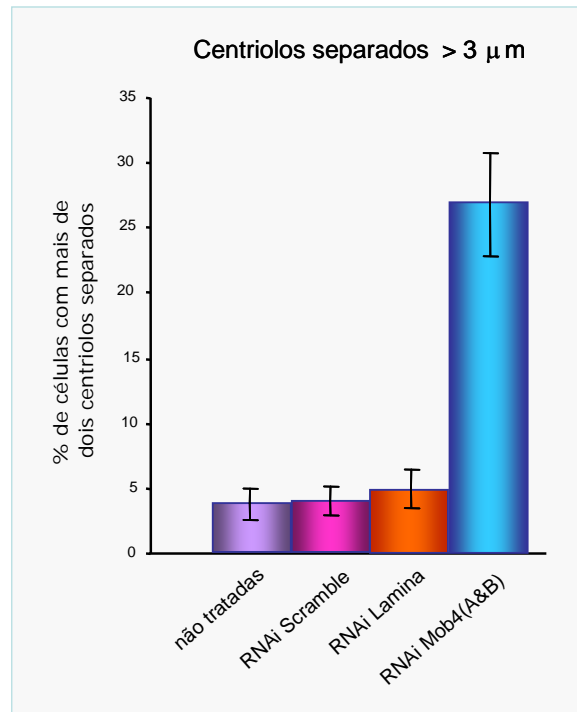


Figura 5.4 – Percentagem de células com dois centríolos separados após RNAi de *hsMob4(A&B)*. Resultados de 3 experiências independentes, com análise de entre 550 a 650 células por experiência.

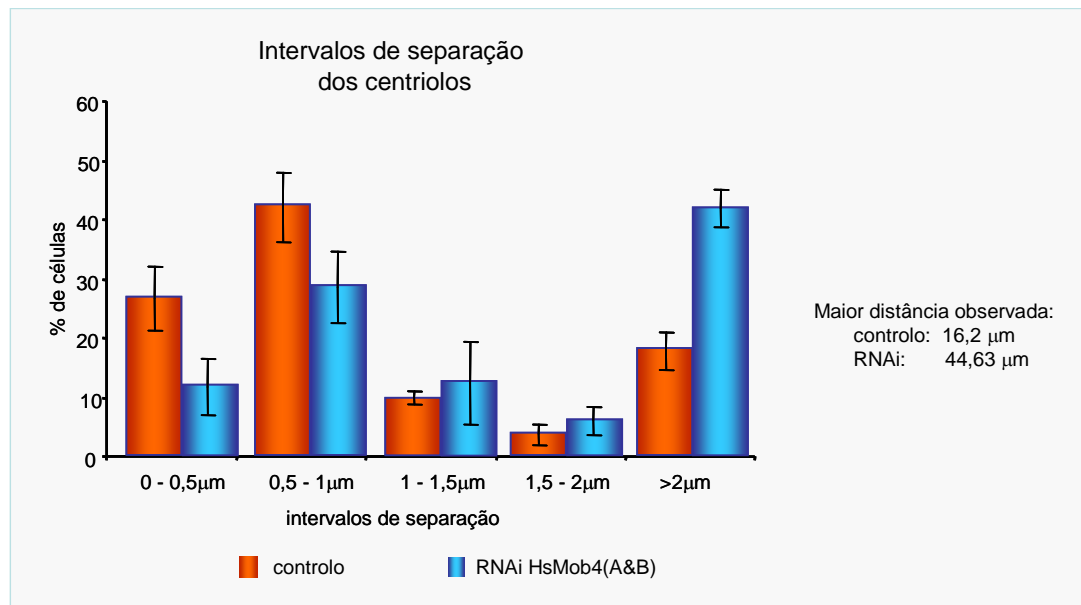


Figura 5.5 – Intervalos de separação observados entre os dois centríolos no RNAi de *hsMob4(A&B)*. Resultados de 3 experiências independentes e análise de 620 células no controle e 690 células no RNAi de *hsMob4(A&B)*.

Assim, conclui-se que a depleção de hsMob4 causa separação dos centríolos, e que não só há um aumento na percentagem de células com os dois centríolos separados, como também a distância entre eles é superior à observada no controlo. As proteínas hsMob4(A&B) parecem ser assim importantes para a coesão dos centríolos.

Observou-se também que a depleção de hsMob4, resultava num aumento de células que se mantinham ligadas numa telofase muito tardia (de 3,8 no controlo para 17,7% nas células sem Mob4). Estas células possuem já a sua cromatina descondensada e o envelope nuclear formado, mas no entanto ainda estavam ligadas, o que sugeria um atraso na citocinese. Devido a esta observação, não será talvez surpreendente que se detecte também um ligeiro aumento no número de células binucleadas (de $1,1 \pm 0,3$ % no controlo para $4,44 \pm 0,1$ % nas células sem Mob4), sugerindo que algumas destas células deveriam eventualmente falhar a citocinese e ficar binucleadas (figura 5.6 A e B).

A depleção de hsMob4 parece causar efectivamente um defeito na correcta execução da citocinese, pois resulta ainda num pequeno número de células sem DNA (citoplastos) (1%) nunca detectadas nos controlos. Muito interessantemente, estes encontravam-se sempre adjacentes a células binucleadas (figura 5.7) e o restício do midbody estava entre elas. Os citoplastos tinham, além disso, tinham sempre um ou dois centrossomas/centríolos, identificados com o anticorpo anti- γ -tubulina. Observou-se mesmo alguns citoplastos ligados por uma ponte intercelular a uma célula binucleada, sugerindo que os citoplastos eram formados devido a uma divisão celular incorrecta (figura 5.7, painel I).

Um resultado bastante surpreendente, foi a observação de cadeias de 3 ou 4, células ligadas por uma ponte intercelular e um midbody (figura 5.8). Estas cadeias de células sugeriam que, na ausência de hsMob4(A&B), as células após a divisão permaneciam ligadas tanto tempo que iniciavam uma nova divisão antes de completarem a citocinese anterior. Efectivamente, na figura 5.8 painel C, apresenta-se uma fotografia de uma célula deplectada em hsMob4(A&B), que confirma esta ideia. Como se pode observar, estas duas células têm o DNA com graus de condensação diferentes: a célula de baixo parece ter o DNA em interfase (descondensado) e a de cima encontra-se em plena anafase, a segregar os cromossomas para os polos do fuso. No entanto, pode observar-se que estas células ainda estão ligadas.

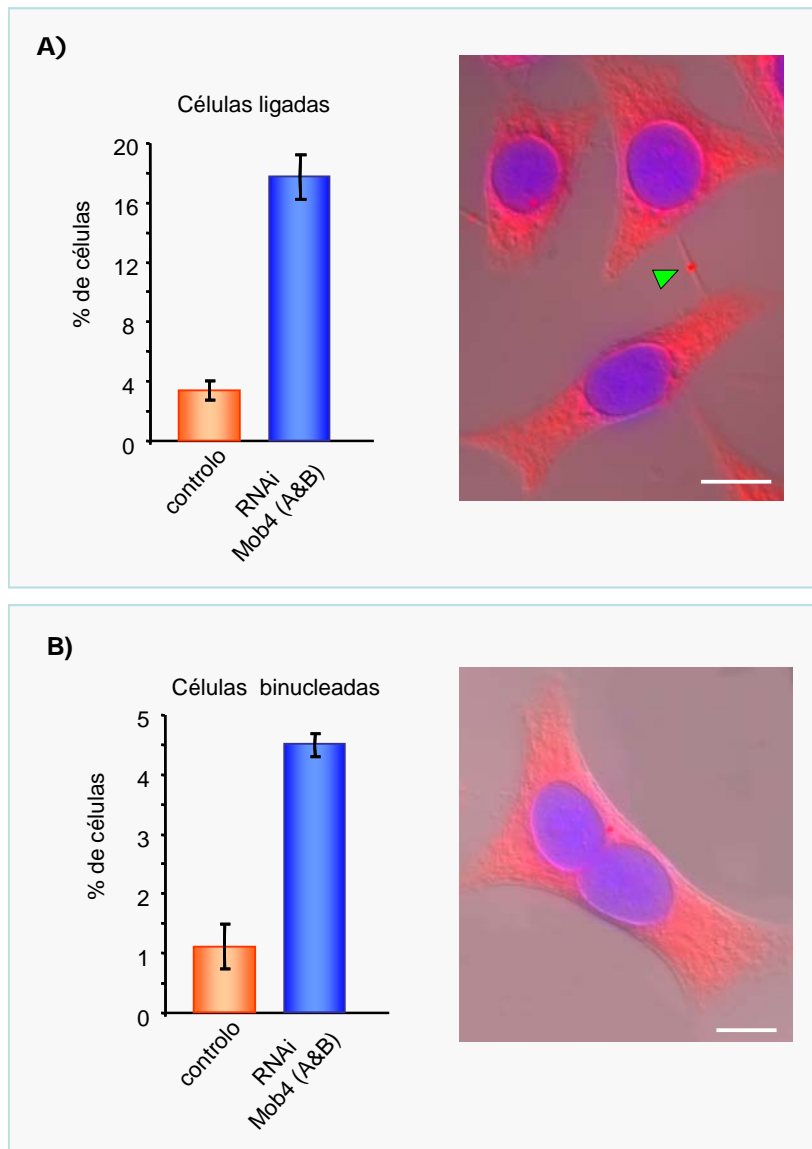


Figura 5.6 – Depleção de *hsMob4(A&B)* causa falhas em citocinese. A) A depleção de *hsMob4(A&B)* causa um aumento no número de células que se mantêm ligadas por pontes intracelulares (seta verde). **B)** A depleção de *hsMob4(A&B)* causa um aumento no número de células binucleadas. (Imagens de DIC + fluorescência, DNA azul, γ -tubulina a vermelho. A barra de escala representa 10 μ m.)

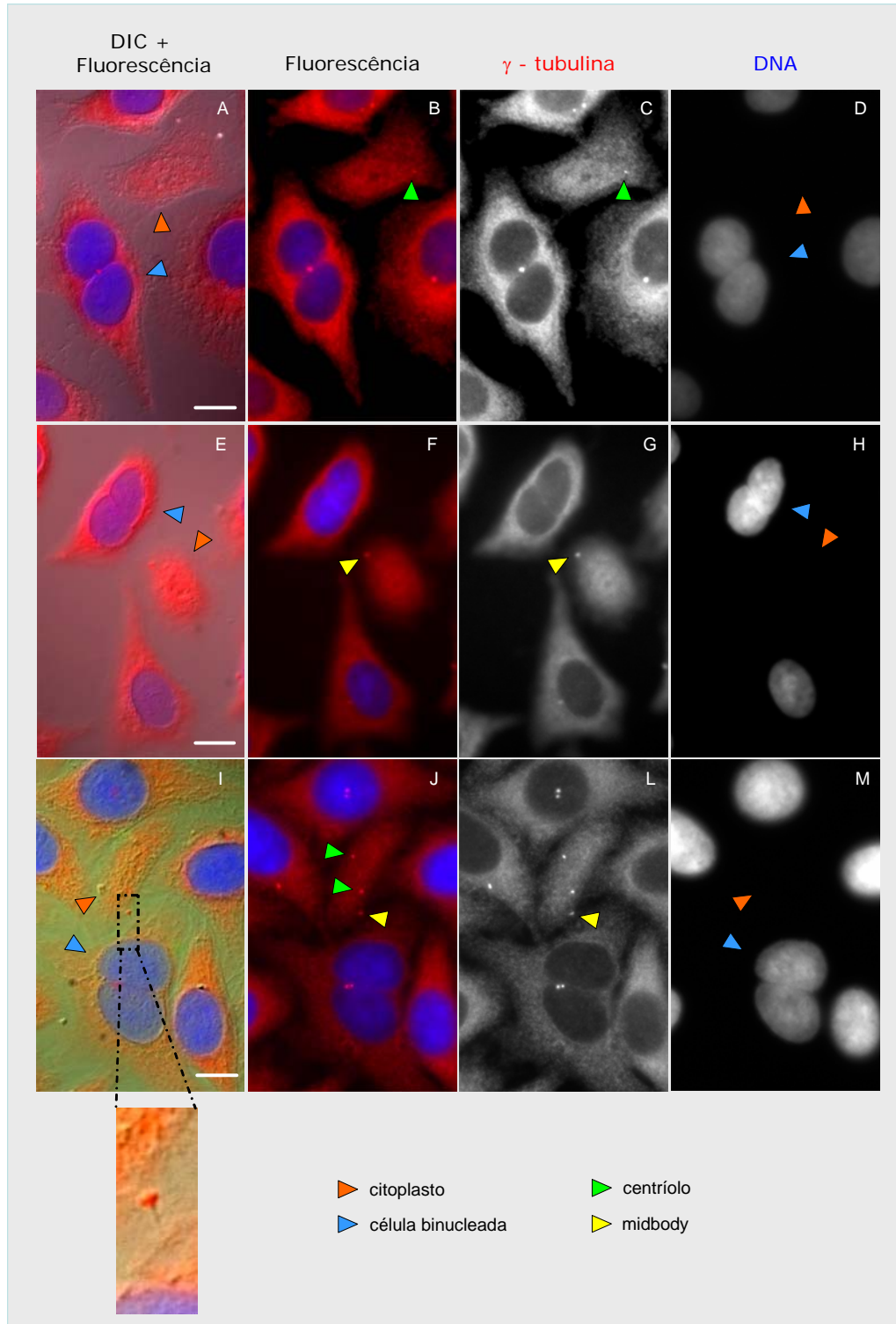


Figura 5.7 – A depleção de *hsMob4(A&B)* causa defeitos de citocinese: formação de citoplastos na vizinhança de células binucleadas. Nos citoplastos observavam-se sempre centrossomas/centríolos identificados pela marcação com γ -tubulina (setas verdes em C/B e J); em alguns casos observava-se o midbody (setas amarelas F/G, J/L). No painel I apresenta-se um citoplasto ligado por um aponte intercelular a uma célula binucleada. A ampliação do painel I destaca a ponte intercelular onde se pode observar o midbody. A vermelho estão centrossomas e a azul o DNA. (A barra de escala representa 10 μ m.)

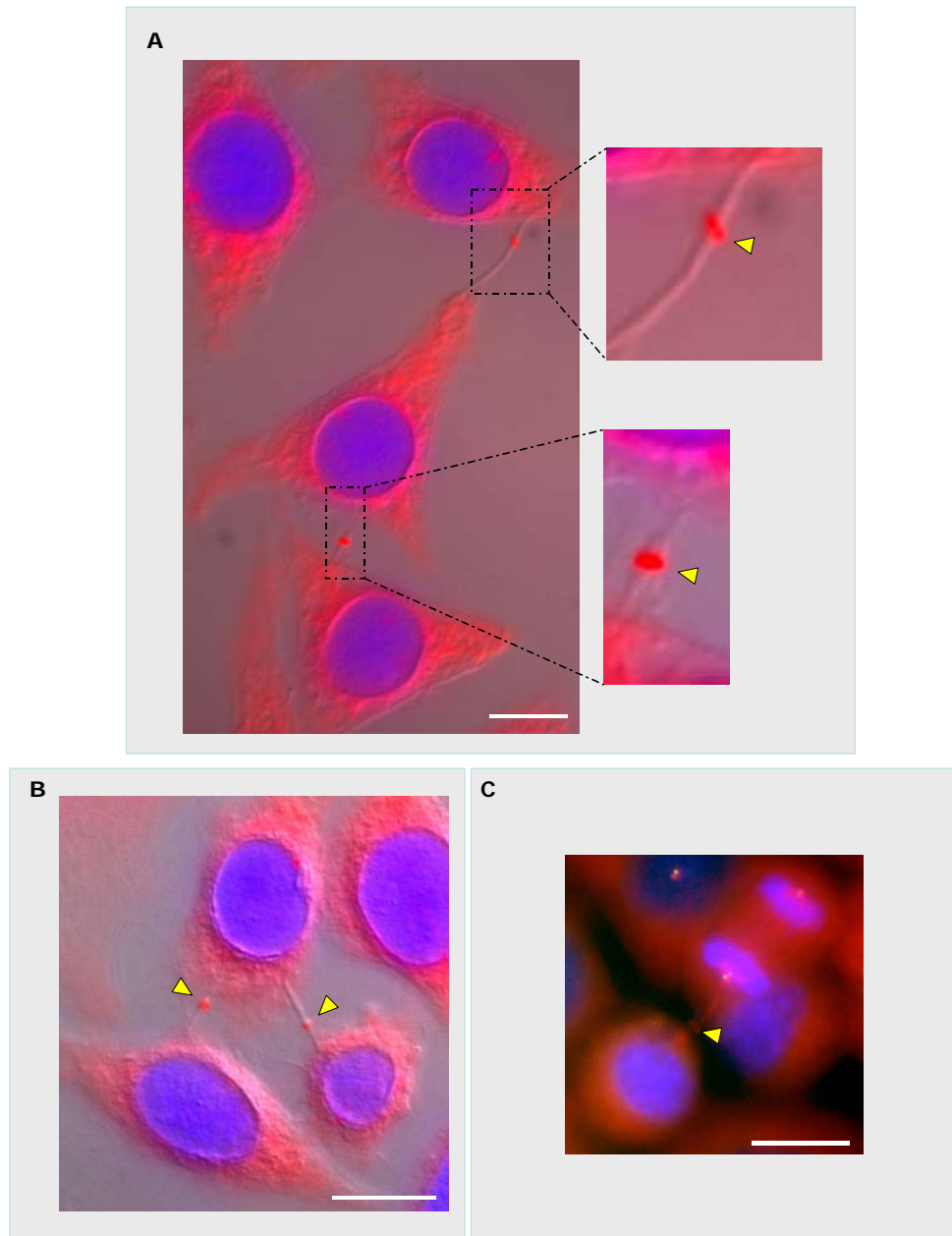


Figura 5.8 – A depleção de *hsMob4(A&B)* causa defeitos de citocinese: formação de cadeias de células. Observaram-se cadeias de células ligadas por pontes intracelulares (A, B). Em C apresentam-se duas células ligadas em que a superior está em anáfase e a inferior parece em interfase. Apresenta-se a vermelho γ -tubulina e a azul o DNA. As setas indicam os midbodies. A barra de escala representa 10 μ m.

Esquematicamente, apresenta-se na figura 5.9 o que poderá acontecer após a depleção de *hsMob4(A&B)*. Após a mitose, as células sem *hsMob4* ficam ligadas por uma ponte intercelular antes de executarem a citocinese (1). Pode então ocorrer a regressão da constrição e a célula ficar binucleada (2), ou as células filhas ficam ligadas por uma ponte

intercelular durante tanto tempo que uma delas teria tempo de iniciar uma nova mitose (3), originando a formação de cadeia de três células (4). Quando observávamos este fenótipo da formação das cadeias de células, este ainda não tinha sido descrito para nenhuma proteína de células de mamíferos. Os resultados apresentados permitem concluir que hsMob4(A&B) são necessários para a citocinese em células humanas, pois a sua depleção causa falhas neste processo. No entanto, o resto do ciclo, incluindo a mitose, não parece afectada.

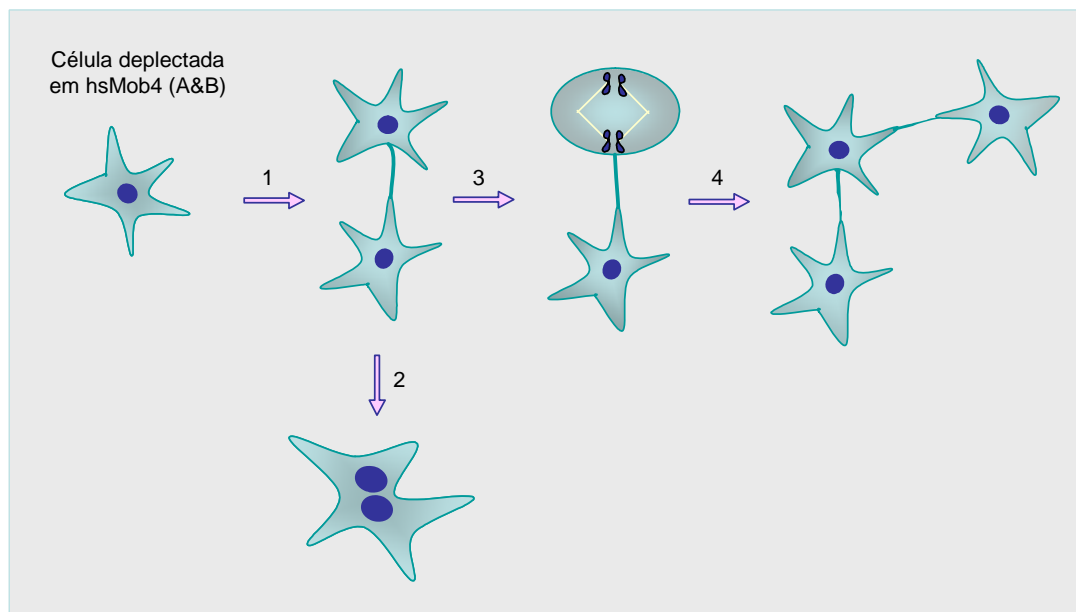


Figura 5.9 – Possíveis mecanismos para a formação das cadeias de células e das células binucleadas após RNAi de hsMob4(A+B).

5.3 Depleção de hsMob4: análise de microscopia *in vivo*

Com o objectivo de estudar a dinâmica da mitose e da citocinese nas células deplectadas em hsMob4(A&B), fez-se a análise do comportamento dessas células por microscopia “*in vivo*”.

Antes de iniciar as experiências de análise *in vivo*, tiveram que se estabelecer as condições dos ensaios. De modo a aumentar a população de células em mitose testaram-se duas formas de sincronização: um duplo bloqueio com timidina ou um bloqueio com timidina seguido de bloqueio com afidicolina. Ambas as técnicas sincronizam as células na fronteira G1/S, e aproximadamente 10h-12h após a libertação do bloqueio as células encontram-se no início de mitose. Os resultados obtidos para as células HeLa-centrina indicam que estas tinham bastante dificuldade em recuperar do bloqueio com timidina/afidicolina e que, por outro lado, recuperam bastante bem do duplo bloqueio com timidina. Neste último caso, as células estavam saudáveis, e prosseguiram pelo ciclo celular

10h após a remoção do bloqueio de timidina (como esperado). Definiu-se também a quantidade de células a semear para que, aquando a realização dos filmes, a densidade celular não impedisse a observação dos midbodies. Para que se observem os midbodies sem dificuldades, as células devem, na altura da transfecção estar com aproximadamente 40% de confluência. Optimizaram-se as condições de transfecção para as caixas pretas², mantendo sempre a mesma concentração de oligo (20 nM), e variando-se a quantidade de oligofectamina utilizada na mistura da transfecção. Utilizou-se 4, 6 e 8 µl de oligofectamina e transfectaram-se as células com um oligo fluorescente (para se poder analisar a eficiência da transfecção). Contaram-se então em 10 campos independentes o número de células transfectadas (fluorescentes - o oligo era marcado com FITC) e o número de células totais; a razão entre estes dois parâmetros seria a eficiência de transfecção. A eficiência de transfecção foi 55% quando se utilizaram 5 µl de oligofectamina, 64,44% quando se utilizaram 6 µl de oligofectamina e 90 % quando se utilizaram 8 µl de oligofectamina. Concluindo, as condições definidas foram que as células seriam sincronizadas com um duplo bloqueio em timidina, transfectadas no intervalo entre os bloqueios utilizando 8 µl de oligofectamina, e que na altura da transfecção as células estariam com 40% de confluência.

Nestas condições realizaram-se as experiências de RNAi e as células foram seguidas por time lapse, onde se analisaram apenas as células que prosseguiram por

mitose. Começou-se por determinar quanto tempo em média cada célula demorava a executar a prometafase, a metafase, a anafase, a telofase, e ainda quanto tempo demorava de telofase até à citocinese (células ligadas). Considerou-se prometafase quando se observava a quebra do envelope nuclear, metafase quando se observavam os cromossomas todos alinhados na placa metafásica, anafase quando se observava a segregação dos cromátídeos irmãos para os polos da célula, telofase quando os cromátídeos irmãos atingiam os polos da célula e se observava a iniciação da contração, e células ligadas desde que o DNA estava descondensado até ocorrência da citocinese (separação/corte das células).

Após a transfecção das células com os oligos controlo e com oligos contra hsMob4(A&B), determinou-se quanto tempo durava cada fase do ciclo (tabela 5.3). Uma análise da tabela 5.3, poderá sugerir que existe um atraso em metafase quando se depleta as células de hsMob4(A&B), pois as células controlos estão 5 minutos em metafase enquanto as células que sem hsMob4(A&B) demoram 10 minutos nesta fase do ciclo. No entanto, este ligeiro atraso em metafase poderá não ser muito significativo por duas razões: a primeira é que, em média, as células HeLa demoram entre 3 a 9 minutos desde o alinhamento dos cromossomas até ao início da anafase, pelo que 10 minutos em metafase é apenas um valor ligeiramente superior; a segunda é que a percentagem de células

² Caixas pretas – Placas de cultura de células adaptadas para a utilização em microscopia *in vivo* de

deplectadas em hsMob4(A&B) que bloquearam em metafase³ foi de 5,7%, enquanto nos controlos esse valor foi de 3,1%, o que uma vez mais, apesar de ser ligeiramente superior, não parece ser muito diferente do observado nos controlos (tabela 5.4). Portanto, a haver um atraso em metafase devido à depleção da hsMob4(A&B), este é ligeiro, e as células parecem resolver esse problema sem aparente dificuldade. Analisando os outros valores da tabela 5.3 conclui-se que as células sem hsMob4(A&B) parecem prosseguir por mitose normalmente.

	Scramble duplex		hsMob4(A&B)	
	(minutos)	(horas)	(minutos)	(horas)
Prometáfase	73,71	1,23	67,27	1,12
Metafase	5,01	0,08	10,06	0,17
Anáfase	13,19	0,22	14,10	0,24
Telófase	64,13	1,07	67,33	1,12
Células ligadas	188,14	3,13	353,26	5,88

Tabela 5.3 – *Duração de cada fase do ciclo celular após RNAi de hsMob4(A+B).*
Analisaram-se 60 células no controlo e 70 células no RNAi de hsMob4(A&B).

No entanto e significativamente, as células sem hsMob4(A&B) demoram em média mais 2h e 45 minutos até completarem a citocinese do que os controlos. Os controlos demoram em média 3h e 8 minutos (resultados que concordam com Piel *et al.* 2001) e as células deplectadas em hsMob4 demoram em média 5h e 53 minutos. Como a apresentação apenas da média do tempo que as células demoram até completarem a citocinese não reflecte bem as disparidades observadas, agruparam-se as células seguidas (60 no controlo e 70 no RNAi de hsMob4(A&B)) em intervalos de tempo desde o início da telófase até citocinese. Como se pode observar, a maioria das células controlo (80%) demorou até 4 h para completar a citocinese, enquanto que 70 % das células deplectadas em hsMob4(A&B) demoraram mais de 4h até conseguirem executar a citocinese. O tempo máximo observado de duas células controlo ligadas por pontes intercelulares foi de 6,5h, e só num caso demorou mais de 6 horas até à execução da citocinese. No RNAi de hsMob4(A&B), o tempo máximo observado até à execução da citocinese foi de 18h, tendo em 23 casos (38,3%) passado mais de 6 horas até se completar a citocinese, e em 12 casos (20%) demorado mais de 8 horas (figura 5.10). Assim, os resultados obtidos por microscopia “*in vivo*” sugerem que a depleção de hsMob4(A&B) provoca um largo atraso na execução da citocinese. Estes resultados coincidem com os observados para as células fixas, nos

dimensão semelhante a um poço de uma placa de 6 alvéolos.

quais se observou um aumento de 4,5 vezes nas células ligadas por pontes intracelulares após a depleção de hsMob4(A&B) (figura 5.6 A). Muito interessantemente, a análise *in vivo* permitiu observar que as células sem Mob4 se mantinham ligadas por pontes intracelulares muito longas (figura 5.11). A análise por célula das experiências de microscopia *in vivo* permitiu também quantificar defeitos observados durante a realização da mitose nas células deplectadas em hsMob4(A&B) (tabela 5.4).

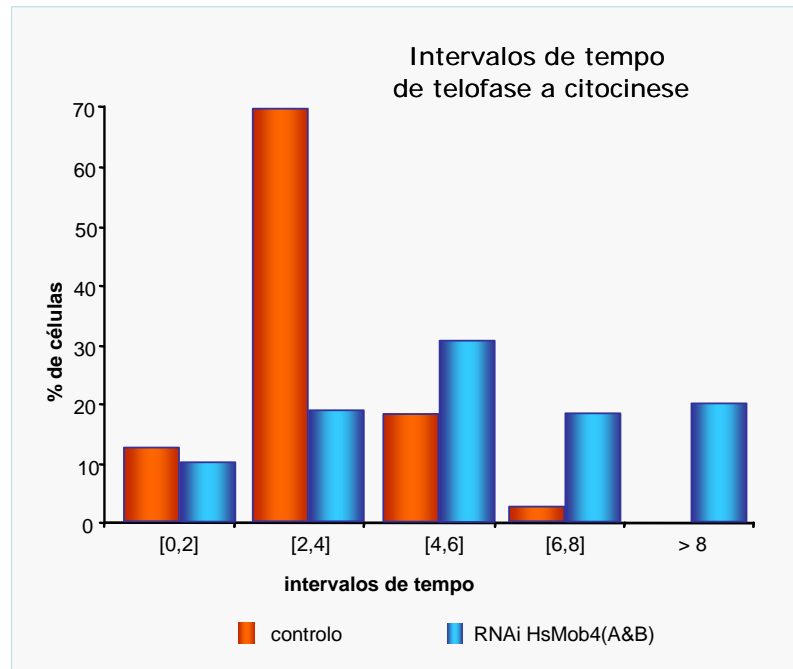


Figura 5.10 – Intervalos de tempo de telofase até citocinese após depleção de *hsMob4(A&B)*. Seguiram-se, em tempo real, 60 células para o controlo e 70 células para o RNAi de *hsMob4(A&B)*.

É possível detectar por DIC a formação da placa metafísica antes do início da anáfase. Assim, observam-se os cromossomas claramente alinhados no centro da célula (placa metafísica) antes do início de anáfase (determinado pela separação dos cromátídeos irmãos). No entanto, nas células sem *hsMob4(A&B)* não se conseguem detectar os cromossomas alinhados na placa metafísica em 42,8% das células antes do início da anáfase, caracterizado pelo alongamento da célula. Este resultado sugere que a depleção de *hsMob4(A&B)* poderá originar problemas na ligação dos microtúbulos astrais ao córtex da célula.

³ Considerou-se que uma célula estava parada em metafase quando se podia observar uma placa metafísica durante mais de 20 minutos. Placa metafísica – observa-se uma placa metafísica quando se detectam os cromossomas alinhados antes de se iniciar a anáfase.

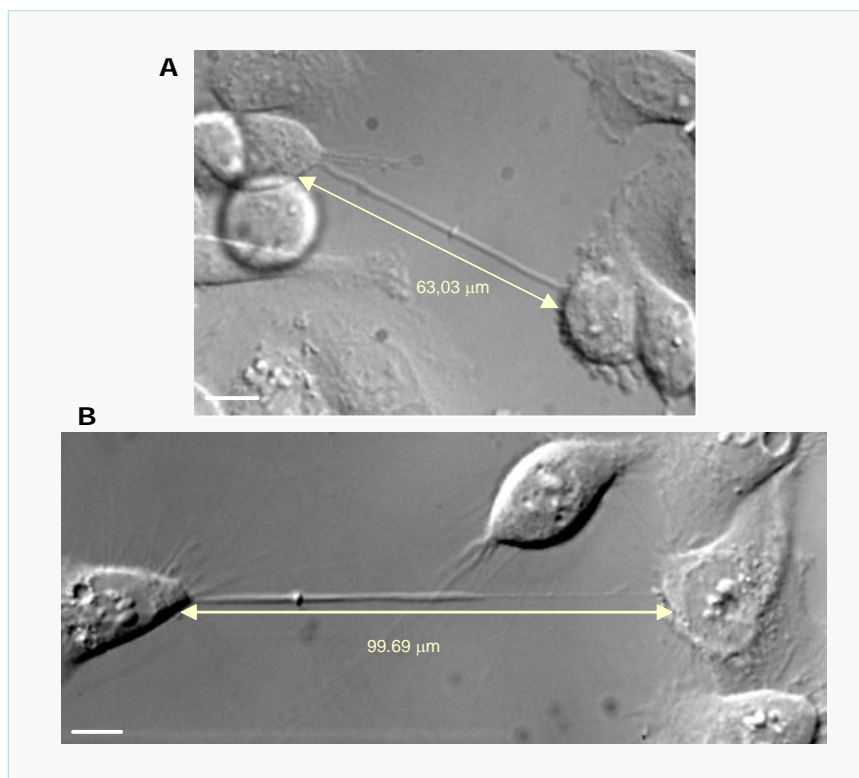


Figura 5.11 – Após depleção de *hsMob4(A&B)* as células mantêm-se ligadas por pontes intracelulares muito longas. (A barra de escala representa 10 μm)

	Scramble duplex	hsMob4(A&B)
Paragem em metafase	3,0	5,7
Não se observa placa metafásica	23,2	42,8
Binucleadas	3,3	16,7
DNA mal segregado	5,1	37,1
citoplastos	0	2,6
Reversão do sulco de clivagem	0	9,0
Sulcos de clivagem extra	9,2	25,7
Cadeia de células	0	6,4
Célula a mover-se	22,6	79,0
Citocinese provocada pelo movimento	1,5	24,3

(Valores em percentagem)

Tabela 5.4 – Defeitos provocados pela depleção de *hsMob4(A&B)*. Analisaram-se 60 células para o controlo e 70 células para o RNAi de *hsMob4(A&B)*.

A observação de que em células sem hsMob4(A&B) o fuso mitótico mede em média 7,35 μm , e no controlo mede 8,04 μm , parece suportar esta hipótese. Tendo em conta que sem hsMob4(A&B) o fuso é mais pequeno, os microtúbulos astrais poderão nem sempre ser longos o suficiente para promover uma ligação eficiente do fuso ao córtex.

A observação de células “*in vivo*” permitiu também confirmar o aumento de células binucleadas observado anteriormente. Observou-se um aumento de células binucleadas de 3,3% no controlo para 16,7% nas células sem Mob4. Esta análise sugeriu ainda um processo de como estas células binucleadas se formam: aproximadamente 70% das células binucleadas formam-se devido a defeitos de citocinese (54% por reversão do sulco de clivagem e 15 % por erros de clivagem) e 31% formam-se devido a segregação incorrecta do DNA. Na figura 5.12 e filme 5.1, apresenta-se um exemplo em que a célula binucleada tem origem devido a reversão do sulco de clivagem. Como observado, a célula executa a mitose normalmente, mas no final da telofase, imediatamente antes da citocinese, em vez das células se separarem, ocorre a reversão do sulco de clivagem e, consequentemente, a fusão dos citoplasmas, ficando a célula binucleada. De notar que a constrição da região central e a formação do midbody parece ocorrer normalmente. É importante frisar que sempre que se observou reversão do sulco de clivagem, a ponte intercelular que separa as duas células filhas tinha um tamanho normal (as duas novas células encontravam-se muito próximas). Quando a ponte intercelular era longa (como por exemplo figura 5.11) nunca se observou reversão do sulco de clivagem. Estas pontes intercelulares longas parecem ser devidas ao facto de as duas células adquirirem mobilidade antes da citocinese ocorrer (ver adiante). Neste caso, as células podem afastar-se ou aproximar-se, e a ponte intercelular “estica” ou “encolhe”, com o midbody sempre visível, mas não ocorre a citocinese nem a reversão do sulco de clivagem. O corte das duas células pode acontecer devido ao facto das células se afastarem demasiado. Na figura 5.13 e filme 5.2 apresenta-se um exemplo de falha de citocinese em que as células se aproximam ou afastam um pouco.

Observou-se que 15 % das células binucleadas totais surgiam devido a erros de clivagem em que todo o material genético fica numa mesma célula mas ocorre a citocinese originando um citoplasto⁴ e uma célula binucleada. Um destes casos é apresentado na figura 5.14 (e filme 5.3), onde a célula indicada parece ter problemas a posicionar o sulco de clivagem e o DNA. O DNA parece passar de uma célula para a outra: no painel D o DNA estava na célula em baixo, no F estava na célula em cima, e no painel H parece voltar novamente para a célula de baixo.

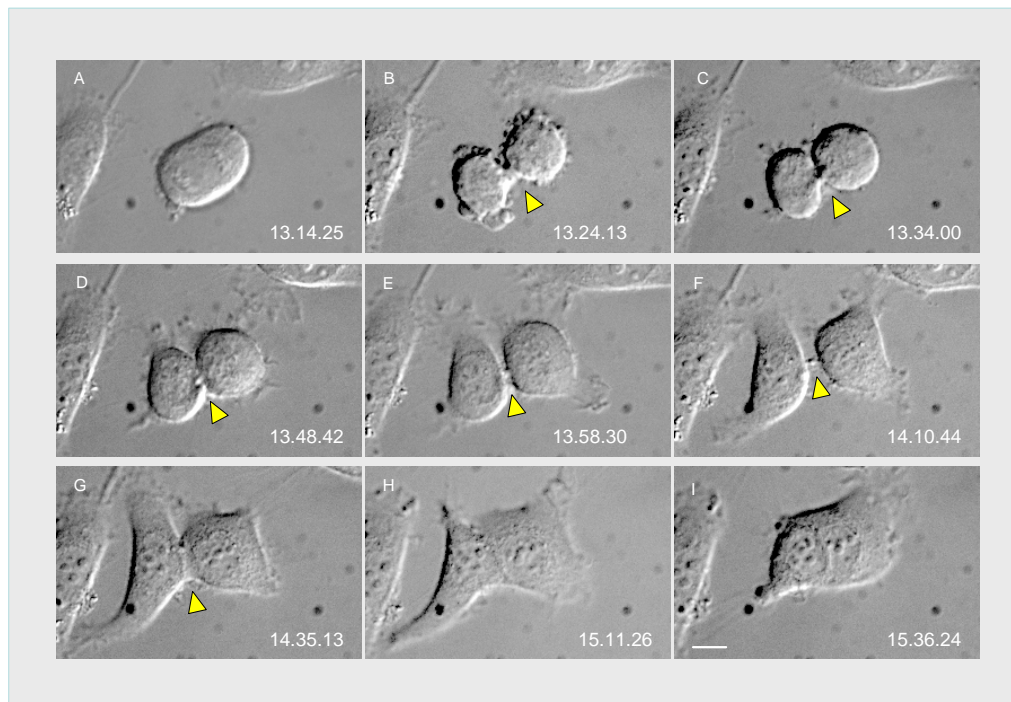


Figura 5.12 – *Algumas células binucleadas formam-se por reversão do sulco de clivagem.* Fotogramas de um ensaio de RNAi : o momento em que cada fotografia foi tirada indica-se no canto inferior direito. As setas indicam a zona de constrição que reverte. (A barra de escala representa 10 µm).

Nos painéis M, N e O observa-se que a célula de baixo ficou binucleada (ver também figura 5.15), e pelos painéis de N a V não se observa nenhum núcleo na célula de cima, que se definiu então como citoplasto. A célula binucleada entretanto movimenta-se para fora do plano da câmara em S e, o citoplasto “destrói-se” em V.

As restantes binucleadas (31%), parecem surgir não devido a problemas de citocinese como os referidos em cima, mas devido a erros na segregação do DNA (figura 5.16). Como se pode observar na figura 5.16, painel A, a célula que se vai dividir (indicada com a seta amarela) só tem um núcleo, em anafase e telofase tem problemas na segregação do DNA (painéis E a I), e obtém-se uma célula binucleada e uma célula com um só núcleo (painéis (N, O e P) (ver também ampliação da célula binucleada, figura 5.17). De notar que na análise por microscopia de fluorescência foi também possível detectar algumas células que apresentavam erros na segregação do DNA. Por exemplo, na figura 5.18 observa-se uma divisão em que a cromatina, mal segregada, está a ser cortada pela constrição (midbody).

⁴ O citoplasto foi definido por não se observar o núcleo em DIC. Em rigor, para confirmar serem citoplastos, teria que ser utilizar um corante de DNA.

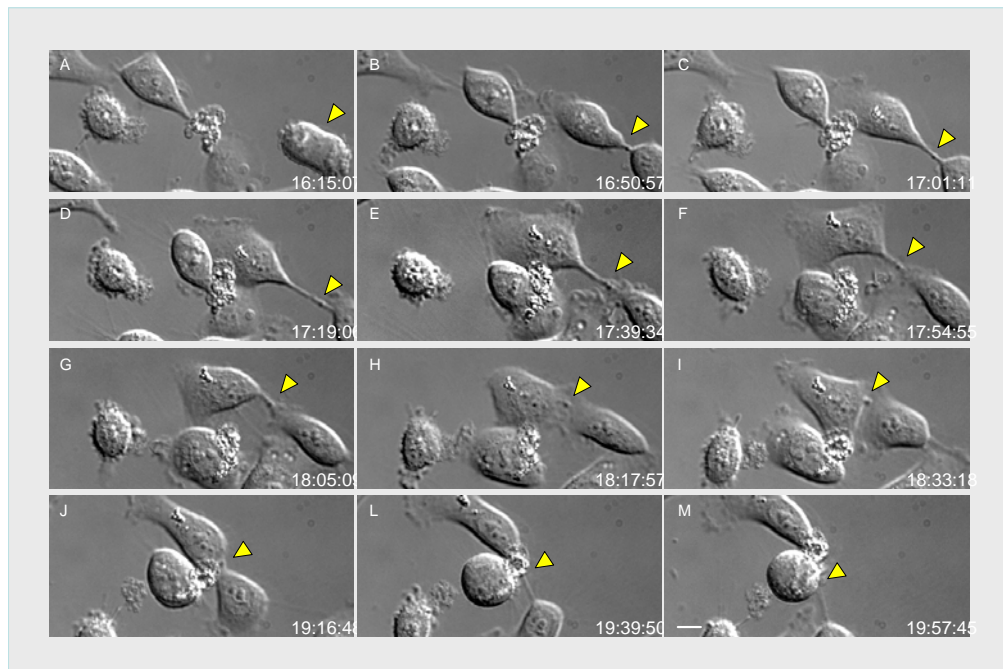


Figura 5.13 – *Pontes intracelulares longas não provocam reversão do sulco de clivagem.* Fotogramas de um ensaio de RNAi: o momento em que cada fotografia foi tirada indica-se no canto inferior direito. As setas indicam a ponte intercelular (de notar que esta alonga e encurta. (A barra de escala representa 10 μ m).

Durante a análise das experiências de microscopia “in vivo” da depleção de hsMob4(A&B), foi ainda possível observar casos em que se formam sulcos de clivagem extra, geralmente dois (um em cada célula filha), que revertiam antes da célula completar a citocinese. Estes sulcos de clivagem extra observam-se quando a célula está em telofase e/ou ligada por uma pequena ponte intracelular (figura 5.19). Como se pode observar no exemplo apresentado, figura 5.19, a célula durante a anafase parece ter problemas em estabelecer o sulco de clivagem, e inicia uma constrição defeituosa (painel E). Entre E e O parece que se formam vários sulcos de clivagem; neste caso três. Em P já só se observam dois sulcos de clivagem; e em R apenas se detecta um sulco de clivagem (ficando a célula ligada por uma fina ponte intercelular), até que finalmente ocorre a clivagem entre as duas células filhas (painel S). É de notar que neste caso a clivagem entre as duas células filhas foi causada pelo movimento de uma terceira célula que atravessou pela a ponte intercelular (figura 5.19), e não devido a uma “citocinese executada pela célula” (esses resultados serão ainda discutidos mais adiante).

A observação de células deplectadas em hsMob4 por microscopia de tempo real permitiu ainda observar a formação de cadeias de células e confirmar a hipótese proposta

no início deste capítulo na figura 5.9⁵. A depleção de hsMob4(A&B) não causa portanto defeitos na saída de mitose, mas sim problemas a nível de citocinese.

A clivagem de 24,3% das células deplectadas em hsMob4(A&B) foi devida ao movimento das células: ou das próprias células em divisão, que ao se afastarem e aproximarem quebram a ponte intercelular, ou de uma 3^o célula que ao atravessar pelo meio da ponte intercelular, que ligava as duas células filhas, provoca a cisão. Observou-se que apenas 1,5% das células controlo tiveram clivagem devida a movimentos celulares. Desta forma, é provável que as células deplectadas de hsMob4(A&B) possam levar ainda mais tempo a completar citocinese do que a média indicada (5,9 horas), caso não ocorressem movimentos celulares que causaram os 25% das clivagens (para os controlos este valor não seria significativamente diferente).

⁵ A hipótese da figura 5.9 foi baseada em observações de células que estavam ligadas mas cujos DNAs tinham graus de condensação diferentes, como se apresenta no painel C da figura 5.8.

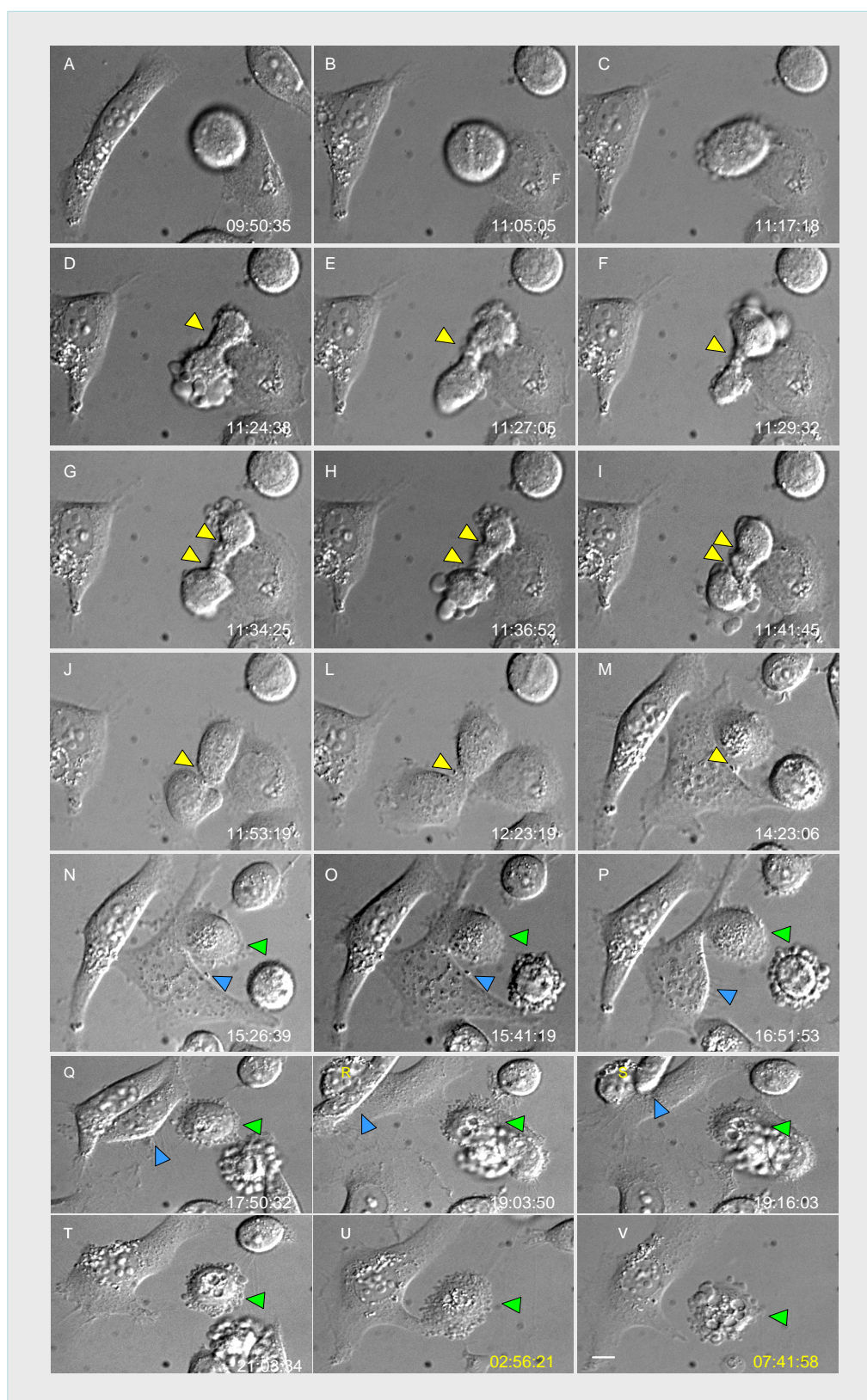


Figura 5.14 – Erros de clivagem após RNAi de *hsMob4(A+B)*. Fotografias ilustrando a formação de um sulco de clivagem aberrante (setas amarelas). Seta azul indica a célula binucleada e a seta verde o citoplasma. (A barra de escala representa 10 μm)

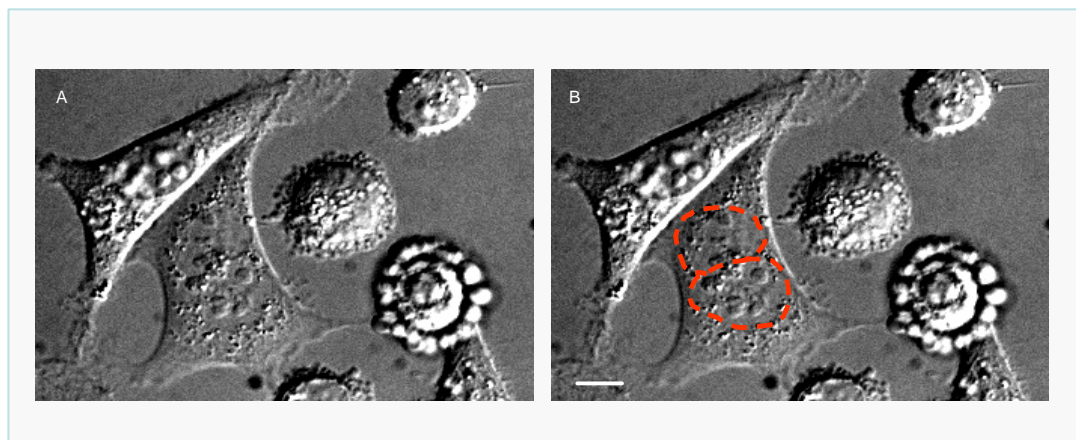


Figura 5.15 – 15 % das células binucleadas totais formam-se devido à depleção de *hsMob4(A&B)* surgem de erros de clivagem. Apresenta-se uma ampliação da célula binucleada que se observa na figura 5.14 (A), a tracejado contornaram-se os dois núcleos (B). (A barra de escala representa 10 μm)

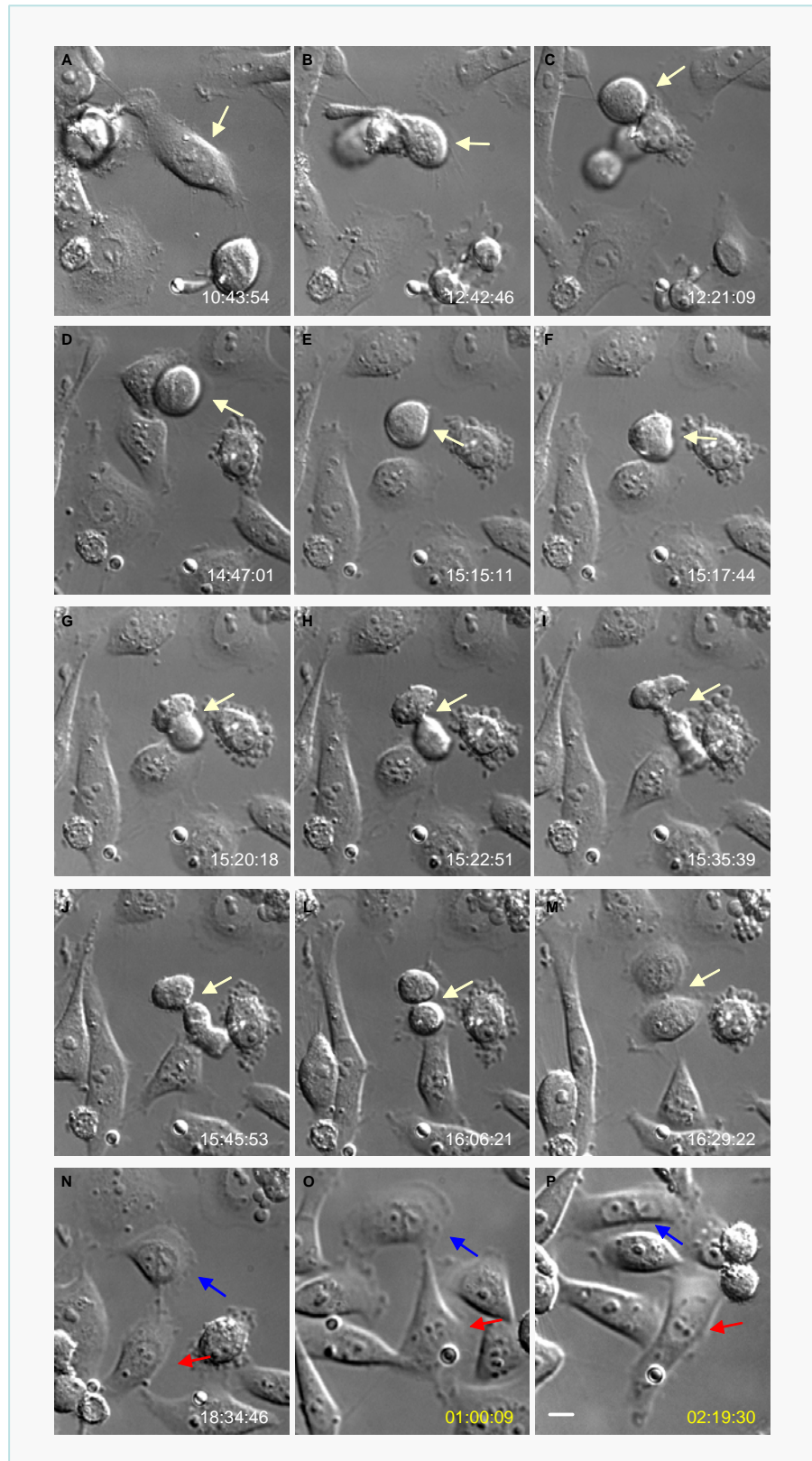


Figura 5.16 – 31 % das células binucleadas totais formam-se por erros na segregação do DNA. Quando se indica o tempo em amarelo significa que o filme passou a meia noite. A seta azul indica a célula binucleada, a seta vermelha indica a célula com um só núcleo e a seta amarela indica a zona de constrição. (A barra de escala representa 10 μm).

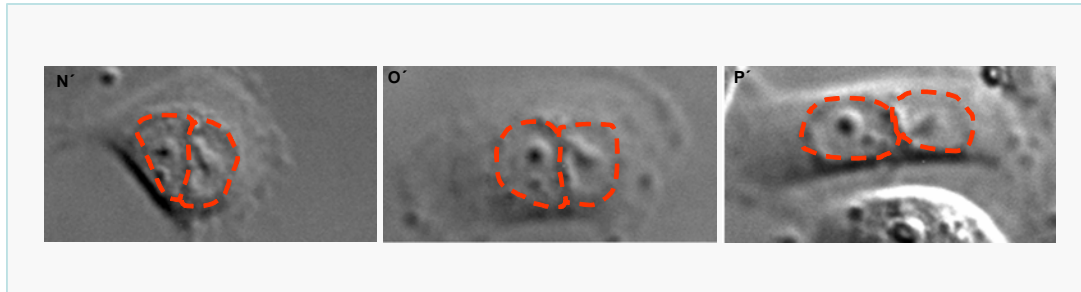


Figura 5.17 – 31 % das células binucleadas totais formam-se por erros na segregação do DNA. Nos painéis N', O', e P', apresenta-se uma ampliação da célula binucleada da figura 5.16 e, salientam-se os dois núcleos a tracejado. (A barra de escala representa 10 μm)

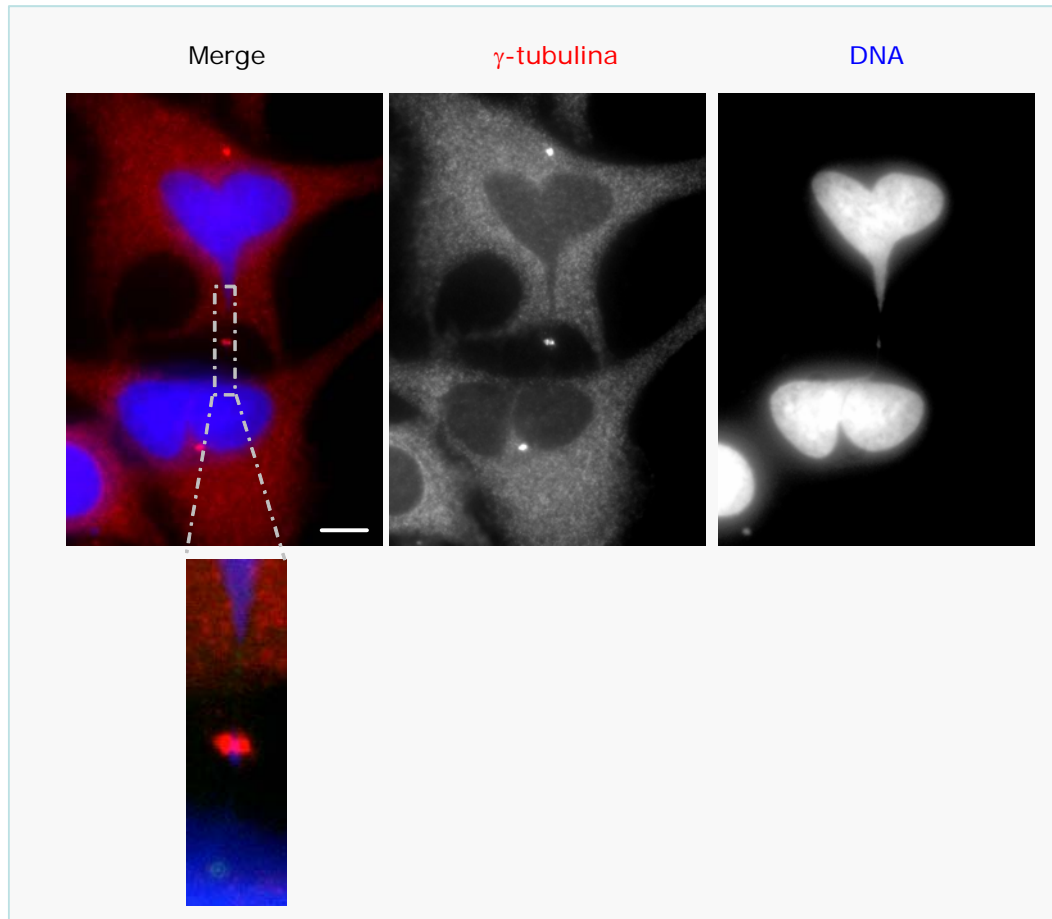


Figura 5.18 – A depleção de *hsMob4(A&B)* causa erros na segregação do DNA. Imagem da análise dos efeitos de RNAi em célula fixas. Observa-se a γ -tubulina a vermelho e o DNA a azul. É possível visualizar o midbody (salientado na ampliação) e no meio deste observa-se uma ponte de DNA. (A barra de escala representa 10 μm)

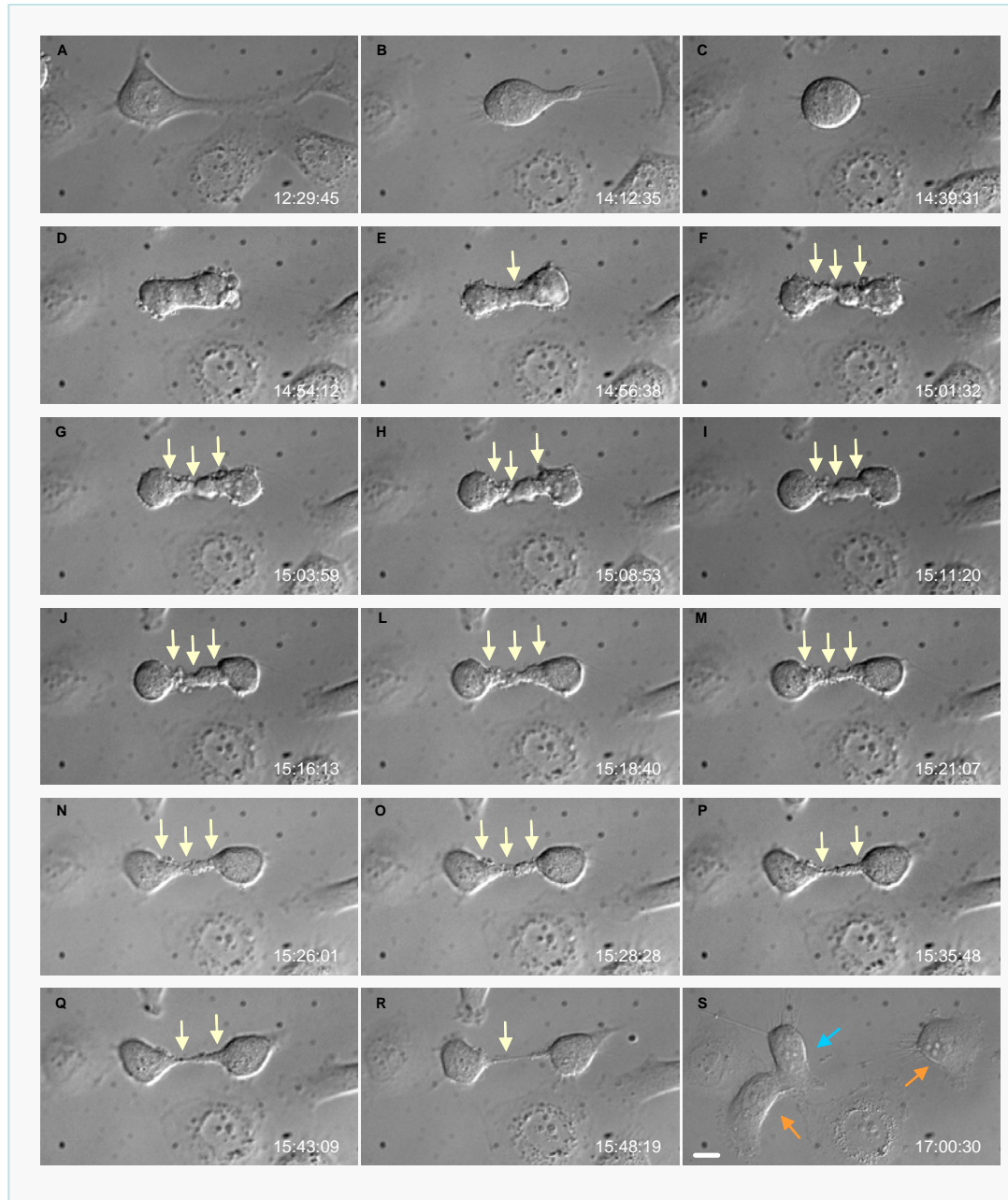


Figura 5.19– A depleção de *hsMob4(A&B)* causa a formação de sulcos de clivagem extra. As setas amarelas indicam os sulcos de clivagem. As setas laranjas indicam as duas células que se dividiram. A seta a azul indica a célula que atravessou a ponte intercelular e precipitou a clivagem entre as duas células filhas. (A barra de escala representa 10 μ m)

5.4 A depleção de hsMob4(A&B) causa mobilidade celular

A observação *in vivo* permitiu ainda detectar algo bastante interessante, e de alguma forma inesperado, que foi observar que as células deplectadas de hsMob4(A&B) ganham uma grande mobilidade. Quando comparados os resultados da mobilidade das células controlo com as células deplectadas em hsMob4(A&B), observou-se que 79% das células sem Mob4 têm mobilidade, comparando com 22,6% nos controlos. Um exemplo da mobilidade observada em células deplectadas é apresentado na figura 5.20 e nos filmes 5.4A e 5.4B. Na figura 5.20, apresentam-se nos painéis A e B duas células que vão iniciar a divisão; após mitose, quando as células estão ainda ligadas (antes de citocinese), no painel C marcou-se uma das 4 células filhas com uma cruz para indicar o início do percurso. Como se pode ver nos painéis de D a H a célula apresenta uma grande mobilidade, a célula desaparece quase completamente do plano da câmara em G, H e I, mas no entanto ainda se consegue observar parte do seu citoplasma, e volta para o plano de focagem em J.

A análise em detalhe do movimento das células deplectadas foi ainda repetida, observando as células com uma objectiva de menor ampliação (objectiva de 20X), de modo a serem seguidas durante mais tempo. Para desenhar os percursos das células e perceber qual o tipo de movimento que executam, marcou-se o centro do núcleo (de todas as células que tinham completado a mitose), e este foi o ponto de referência seguido durante todo o filme⁶. Analisaram-se os percursos de 100 células para a depleção de hsMob4(A&B) e de 57 células para a experiência controlo. Como se pode ver na figura 5.21, há diferenças substanciais no tipo de movimento observado nas células deplectadas em hsMob4(A&B) e no controlo. Na figura 5.21 A e B apresenta-se uma representação gráfica dos movimentos observados para as células transfectadas com duplex contra hsMob4(A&B), ou para as células tratadas com *scramble duplex*. Os limites do gráfico representam os limites do que se podia observar no filme (o campo de observação).

Observa-se no controlo que algumas células se movimentam um pouco, mas no entanto na sua maioria permanecem imóveis. O que se observa, é que as células controlo apresentam um ligeiro reposicionamento, após a divisão (quando se estabelece a aderência, representado pelas várias linhas rectas). O gráfico B) representa uma situação drasticamente diferente desta. A grande maioria das células deplectadas de hsMob4(A&B) move-se bastante em todo o plano de observação. Verificamos que apenas $8,9 \pm 4$ % das células deplectadas em hsMob4(A&B) tem o reposicionamento observado nos controlos. É também notório que o movimento das células sem hsMob4(A&B) parece ser bastante

⁶ Cada vez que o núcleo mudava de posição desenhava-se uma linha a indicar esse percurso.

aleatório, e estas mudam de direcção frequentemente (figura 5.22). Como apresentado na figura 5.22, 62% das células sem hsMob4 mudam mais de 6 vezes o sentido do seu movimento, enquanto tal acontece a apenas 3,35% das células controlo.

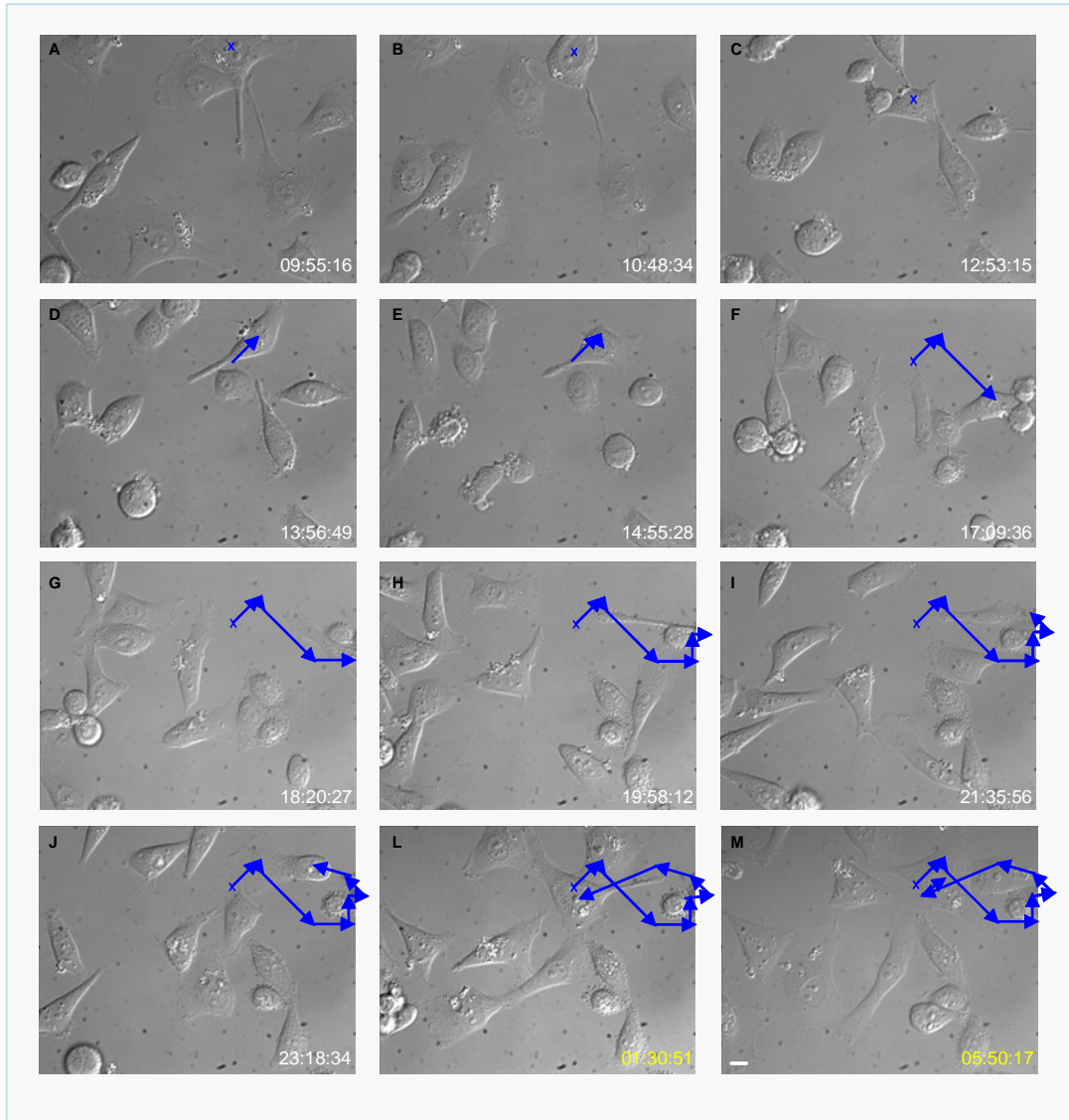


Figura 5.20 – A depleção de hsMob4(A&B) provoca mobilidade celular. As setas azuis, indicam o percurso seguido pela célula depletada de hsMob4(A+B). Neste painel, apresentam-se algumas fotografias de um filme de 22-23 horas; o momento em que cada fotografia foi tirada indica-se no canto inferior direito. Quando se indica o tempo em amarelo significa que o filme passou a meia noite. (A barra de escala representa 10 μ m).

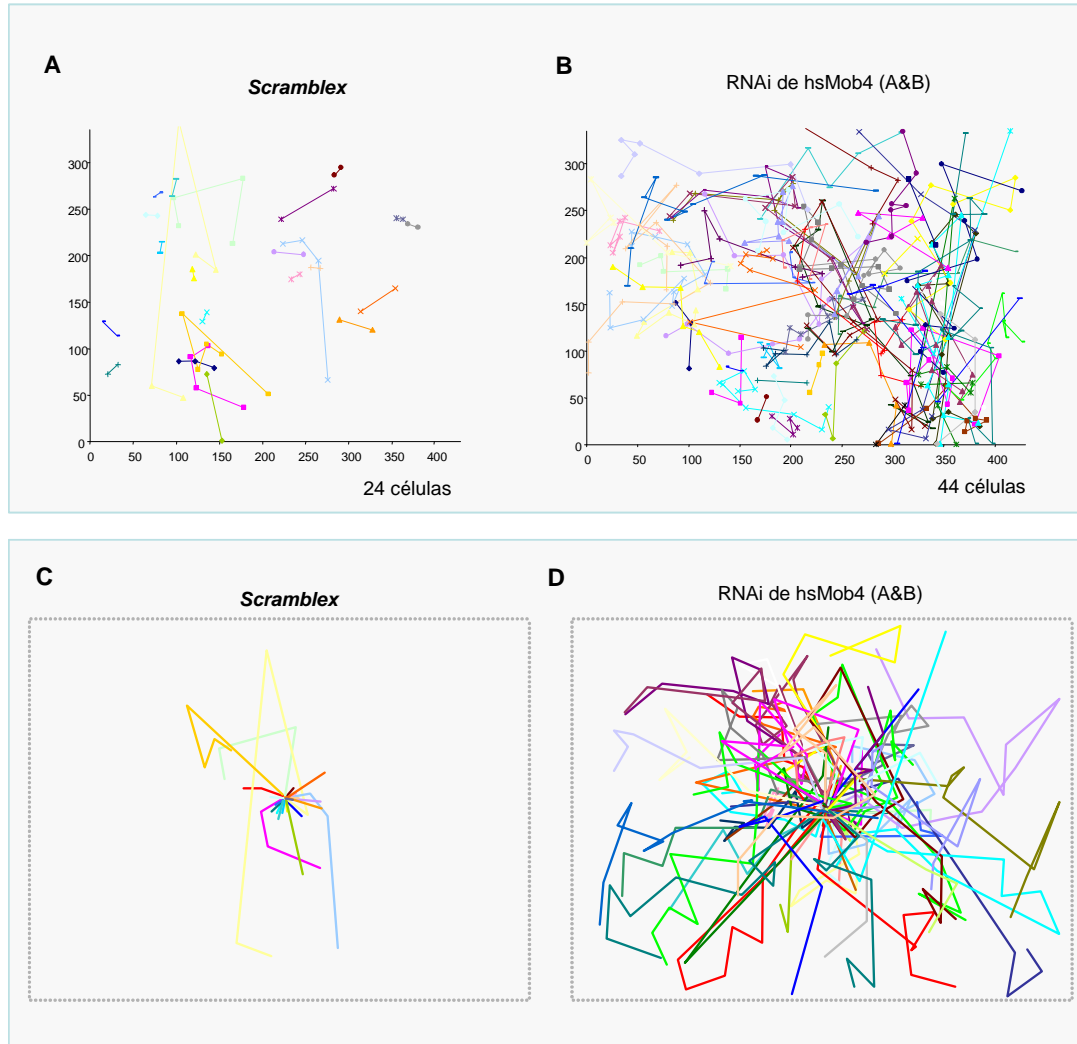


Figura 5.21 – A depleção de *hsMob4(A&B)* induz movimento celular. **A** e **B**, gráficos representativos do movimento em células controlo e depletadas de *hsMob4* respectivamente. **C** e **D** representação dos movimentos indicados em A e B mas com origem num mesmo ponto central.

Ao analisar a média distância percorrida, verifica-se que as células sem *hsMob4* movem-se 267,5 μm e, as células controlo movem-se 62,4 μm . Um outro resultado curioso, é que as células sem *hsMob4* parecem fazer um movimento mais ou menos radial em volta da zona inicial. Em relação ao ponto inicial, as células movem-se em média apenas 94,67 μm (e o percurso total é de 267,52 μm). No entanto, os controlos (que como já dissemos apenas parecem deslizar ligeiramente da sua posição inicial) têm uma distância média entre o início e o fim do movimento de 43,8 μm , e o seu percurso total é de 62,39 μm . Estes resultados sugerem que efectivamente o movimento das células sem *hsMob4(A&B)* deverá ser bastante aleatório e que as células não se afastam linearmente do ponto inicial. Nas

figuras 5.21 C e D, representam-se os percursos das células se tivessem todas partido de um ponto comum (o centro marcado com uma estrela preta). Como se pode observar, as células controlo movem-se geralmente em linha recta e pequenas distâncias, e que muito poucas células se movem alguma distância mas fazem-no em percursos mais ou menos lineares que se afastam do centro. Por outro lado, as células sem hsMob4(A&B) apresentam movimentos bastante irregulares, cujo percurso total do movimento é muito superior à distância que efectivamente as afasta do seu ponto de partida inicial.

É de notar que se mediu sempre o movimento marcando os núcleos das células, e que em alguns casos as células se esticavam bastante e o seu núcleo variava de posição. Associado aos movimentos causados pela depleção de hsMob4(A&B), observava-se frequentemente o que parecia ser um rearranjo do citoesqueleto: as células arredondavam completamente (como se fossem entrar numa segunda mitose) ou modificavam a sua distribuição do citoplasma e, seguidamente voltavam a mover-se um pouco. Todas as células sem hsdMob4(A&B) que se movimentavam, pareciam ter alterações na estrutura do citoesqueleto, pois a sua morfologia mudava bastante ao longo de todo o filme.

Finalmente, é também de referir que os valores apresentados de mudança de direcção do movimento e de perímetro total percorrido, estão limitados ao campo de observação no microscópio. Uma fracção significativa das células sem hsMob4 (31%) saiu do campo de observação, enquanto que apenas 8,7% dos controlos se apresentam nessa situação (em muitos casos porque iniciaram o movimento já no limite do campo).

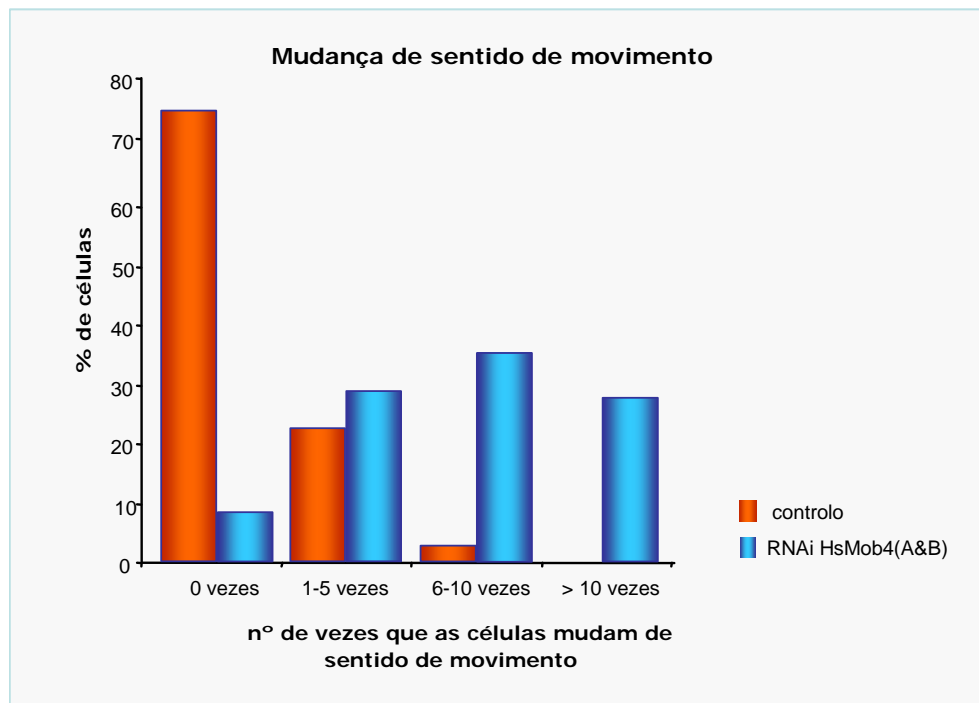


Figura 5.22 – A depleção de hsMob4(A&B) causa uma constante mudança no sentido do movimento das células.

5.5 Discussão

Neste capítulo analisou-se a função intracelular das proteínas hsMob4 por recurso à técnica de RNAi e analisando o fenótipo gerado em células fixas e em microscopia de tempo real. Observou-se deste modo que as hsMob4 são importantes para **coesão dos centríolos**, para a **execução da citocinese** e ainda que a sua depleção induz **mobilidade celular**.

Fenotipicamente, o efeito mais evidente devido à depleção das hsMob4 é uma incapacidade das células de completarem **citocinese**. As falhas de citocinese foram observadas em diferentes condições, tanto em imunofluorescência de células fixas, como em microscopia de tempo real. Observou-se um aumento de células ligadas (por pontes intracelulares longas), um aumento de células binucleadas, a formação de cadeias de células, um aumento do tempo que as células demoram até completarem a citocinese (até 18h), e em alguns casos, divisões anormais resultando em citoplastos e células binucleadas. Significativamente, as células sem hsMob4 parecem executar mitose normalmente, falhando apenas a citocinese. Todos estes defeitos, sugerem que as proteínas hsMob4 fazem parte do mecanismo que controla a citocinese em células de eucariotas superiores. De referir que longas pontes intercelulares semelhantes às que se observam a ligar as células aquando da depleção de hsMob4, foram apenas muito recentemente descritas (e já no decorrer deste trabalho) para a sobreexpressão de Cdc14A (Kaiser *et al.*, 2002) e para a depleção da centriolina (Gromley *et al.*, 2003). Tanto a proteína Cdc14A como a centriolina⁷ são homólogos de componentes de MEN em *S. cerevisiae*, essenciais para a correcta citocinese na levedura. A observação de um fenótipo comum entre estes três homólogos de MEN, sugere a existência de uma conservação da cascata de sinalização em eucariotas superiores. As células sem hsMob4 ficavam ligadas durante tanto tempo, que se observou a formação de sincícios (cadeias de células interligadas sem terem executado a citocinese). Algo semelhante parece acontecer após a depleção da centriolina (Gromley *et al.*, 2003). É também interessante lembrar que tanto a centriolina como a Cdc14A e as hsMob4 têm uma localização centrossomal, e que em particular a centriolina e hsMob4 se localizam apenas no centríolo mãe em telofase (antes de citocinese). Estudos recentes implicaram directamente a necessidade de uma actividade centrossomal para a finalização da citocinese. Se se remover os centrossomas de uma célula em interfase com uma agulha

⁷ A centriolina é uma proteína que estruturalmente tem alguma conservação com a proteína de *S. cerevisiae* Nud1, que é um componente da MEN. Nud1 é o esqueleto estrutural onde alguns dos componentes dessa cascata de sinalização estão ancorados (Gruneberg *et al.*, 2000).

(Hinchcliffe *et al.*, 2001) ou se se destruíssem os centrossomas de uma célula mitótica através da exposição destes a um raio laser (Khodjakov & Rieder, 2001), observam-se defeitos citocinéticos, paragem em citocinese, e até falhas de citocinese que resultam no aparecimento de células binucleadas. Os estudos realizados por Piel *et al.* (2001), revelaram que é necessário a movimentação do centríolo mãe até ao midbody e o seu reposicionamento no centro da célula para que a citocinese ocorra (em célula de mamíferos). Estes autores, sugeriram que o centríolo mãe pudesse ancorar um mecanismo regulador da citocinese em células de mamíferos. A ser assim, existe uma analogia ao que se conhece para *S. pombe* e *S. cerevisiae*, onde se sabe que existem ancorados aos SPBs os mecanismos que controlam a citocinese e a saída de mitose (SIN e MEN). As informações publicadas sobre a Cdc14A e a centriolina, e os resultados apresentados neste capítulo, sugerem que existe um mecanismo de regulação da citocinese em vertebrados, e que pelo menos três das proteínas homólogas de componentes de MEN de SIN (centriolina, Cdc14 e hsMob4(A&B)) pertencem a esse mecanismo.

Uma indicação muito forte de que existe uma estrutura que mantém a **coesão dos centríolos** de um centrossoma (mantém os centríolos ligados), é que em preparações de centrossomas purificados de células, estes possuem sempre dois centríolos, mesmo quando o citoesqueleto foi destruído (Bornens M & Moudjou M, 1999). Ainda não se sabe exactamente o que é essa estrutura, mas já se identificaram recentemente algumas proteínas importantes para a coesão dos centríolos: RanBP1, CP110, Cdk2, Nek2, Rock e Cdc14A (Fiore *et al.* 1999; Chen *et al.* 2002; Meraldi & Nigg, 2001; Fry *et al.*, 1998; Faragher & Fry, 2003; Chevrier *et al.*, 2002; Mailand *et al.*, 2002).

A sobreexpressão de RanBP1 causa a separação dos centríolos em célula mitóticas, provocando a formação de fusos multipolares (Fiore *et al.* 1999). Como a depleção de hsMob4(A&B) não parece ter influência na separação dos centríolos nos centrossomas mitóticos, a RanBP1 deverá causar a separação dos centrossomas por um mecanismo independente de hsMob4(A&B). A separação dos centríolos em células sem Mob4 parece aliás ocorrer após anafase, pois não se observaram células em metafase ou anafase com os centríolos separados.

A cinase Cdk2 e a proteína CP110 (que é um substrato de ciclina E/Cdk2, ciclina A/Cdk2, ciclina B/CDK2), estão implicadas na separação dos centrossomas em células em interfase (Chen *et al.* 2002). Sabe-se que Cdk2 é essencial para a duplicação dos centrossomas, e é possível que essa separação seja um pré-requisito para a formação do procentríolo (início da duplicação dos centrossomas). A expressão ectópica de um mutante não fosforilável de CP110, ou depleção de Cp110, causa a separação dos centrossomas em interfase e também interfere com a duplicação dos centrossomas (em células bloqueadas com hidroxiureia) (Chen *et al.* 2002). Neste trabalho não se testou se há

alteração na cinética de duplicação dos centrossomas nas células sem hsMob4(A&B). No entanto, ao analisar as células sem hsMob4(A&B), não se observou qualquer aumento no número de fusos com centrossomas/centríolos supranumerários ou monopolares, o que sugere que a duplicação dos centrossomas decorre normalmente, ou que, a haver um atraso, a célula terá mecanismos de compensação eficientes. Por outro lado, um ensaio de bloqueio da duplicação do DNA com hidroxureia⁸ (em células deplectadas de hsMob4(A&B)), permitiria ter mais evidências se estas proteínas estão ou não envolvidas na duplicação dos centrossomas.

Quando sobreexpressa, a cinase Nek2 causa separação prematura dos centrossomas (Fry *et al.*, 1998). Uma hipótese será que Nek2 regula a coesão dos centríolos, através da fosforilação de C-Nap1 (proteína que se julga servir de elo de ligação entre os dois centríolos). A fosforilação de C-Nap1 (por Nek2) provocará a despolimerização ou degradação desta proteína, quebrando-se desta forma a ligação entre os dois centríolos (Fry *et al.* 1998 b)). No entanto, este modelo foi recentemente posto em causa por Faragher e Fry (2003). Estes autores demonstram que a sobreexpressão da cinase Nek-2 causa uma separação dos centríolos em interfase (sugestivo da perda de coesão entre os centríolos), mas que a proteína C-Nap1 ainda se localiza nos centríolos. Uma das hipóteses possíveis, é que hsMob4(A&B) possa ser um substrato de Nek-2. Se hsMob4(A&B) for um elemento de coesão dos centríolos, a sua depleção causaria a separação destes (como se verifica).

Uma outra proteína que se demonstrou ser importante para a coesão dos centrossomas, foi a cinase Rock (Chevrier *et al.*, 2002). A depleção/inibição de Rock causa uma separação permanente dos centríolos em G1 e precipitação da citocinese causada por um movimento dos centríolos até ao midbody. A cinase Rock é também um dos possíveis elementos de coesão dos centríolos, pois por microscopia electrónica parece estabelecer uma ligação entre os centríolos (Chevrier *et al.*, 2002). Interessantemente, a cinase Rock é uma cinase tipo Dbf2. Em leveduras, a Dbf2 é a cinase que se sabe interagir com scMob1, sendo esta interacção essencial para que a célula saia de mitose e complete a citocinese (Komarnitsky *et al.*, 1998). Por estas razões, a cinase Rock será um potencial parceiro molecular das hsMob4

A sobreexpressão da fosfatase Cdc14A, também causa separação prematura dos centrossomas em fase S e as células não apresentam sinais de entrada em mitose (Mailand *et al.*, 2002). A proteína Cdc14 de *S.cerevisiae* é a fosfatase que se pensa estar no final da

⁸ Em sistemas embrionários e em células somáticas, é possível desacoplar a replicação do DNA da duplicação dos centrossomas usando inibidores da síntese do DNA. Um tratamento prolongado com hidroxureia permite que se dêem múltiplos ciclos de duplicação dos centrossomas sem ocorrer

cascata de sinalização da saída de mitose. Neste organismo a Cdc14 tem que ser activada pelo complexo Dbf2/Mob1, indo depois promover a desfosforilação das ciclinas mitóticas e a consequente saída de mitose. Em humanos, tanto a Cdc14A, como hsMob4(A&B) parecem ter uma função importante na coesão dos centríolos, visto que a sobreexpressão da primeira e a depleção da segunda provoca a separação dos mesmos.

Em resumo, a depleção de hsMob4(A&B) causa uma evidente perda de coesão dos centríolos. Apesar do fenótipo observado, a progressão do ciclo celular e a duplicação dos centrossomas não parecem ser afectadas. Pode ser que a coesão dos centríolos seja importante para manter uma estrutura estável do citoesqueleto da célula.

A **mobilidade das células** de metazoanos é responsável por vários processos celulares, como por exemplo a formação de tecidos, a cicatrização de feridas, a resposta imune e a metastização de tumores. As células em migração apresentam uma polarização característica do citoesqueleto de actina. A organização dinâmica do citoesqueleto de actina fornece a força necessária para a mobilidade celular e é regulada por GTPases da família das proteínas Rho (Rac1, RhoA e Cdc42) (revisto em Wittmann & Waterman-Storer, 2001). A polarização do citoesqueleto de actina é gerada através de um gradiente celular desta proteína, e este é provavelmente gerado através da activação localizada de proteínas que se pensa controlarem a dinâmica da actina (RhoA, hsCdc42 e Rac1) (revisto em Wittmann & Waterman-Storer, 2001). Sabe-se que os microtúbulos estão polarizados nas células em migração, e as evidências apontam para que ao gradiente de actividade das GTPases Rho, poderá ser modulado pelos microtúbulos. Em muitas das células em migração, o centrossoma orienta-se para a direcção de migração e posiciona-se à frente do núcleo, indicando o caminho (revisto em Wittmann & Waterman-Storer, 2001). Como resultado desse posicionamento do centrossoma, os microtúbulos são polarizados e tendem a alinhar-se no eixo de migração da célula (revisto em Wittmann & Waterman-Storer, 2001). Após o estabelecimento da assimetria da rede dos microtúbulos, esta afecta a actividade da proteína Rho. A proteína Rho poderá promover a formação de assimetrias no citoesqueleto de actina, e estas poderão resultar no movimento da célula (revisto em Wittmann & Waterman-Storer, 2001).

Neste trabalho, observou-se um fenótipo em que as células sem hsMob4(A&B) ganham uma enorme mobilidade celular e fazem um movimento errático. Em células fixas, observou-se também que a depleção de hsMob4(A&B) induz a separação dos centríolos. Se nas células sem hsMob4(A&B), os centríolos para além de estarem separados tiverem um movimento errático no citoplasma celular, este iria provocar a polarização da rede dos

microtúbulos de uma forma errática e variável. Essa polarização errática da rede de microtúbulos, poderá promover a polarização do citoesqueleto de actina e a mobilidade celular. O movimento celular é geralmente unidirecional, e não estão descritas constantes mudanças de movimento numa célula (o que está de acordo com os resultados obtidos nos controlos). No caso da depleção de hsMob4(A&B), observou-se uma constante mudança de direcção de movimento das células. O que se pretende salientar, é que o tipo de movimento (errático e com frequentes mudanças de direcção) que as células sem hsMob4(A&B) têm, possa ser devido a uma desorientação dos centríolos na célula, especialmente do centríolo mãe. Este deixaria de ter a sua posição fixa no centro da célula, poderia promover a polarização dos microtúbulos em diferentes sentidos e, impulsionar o movimento celular e a mudança de sentido deste.

5.6 Legendas dos filmes

Filme 5.1 (referente à Figura 5.12) – *Formação de células binucleadas por reversão do sulco de clivagem.* O filme mostra uma célula que imediatamente após a constrição reverte o sulco de clivagem e fica binucleada.

Filme 5.2 (referente à Figura 5.13) - *Falhas de citocinese por formação de pontes intercelulares longas.* Observar a célula da extremidade direita. A célula divide-se e falha a clivagem, mas o sulco não reverte. De notar o aumento e diminuição da ponte intercelular.

Filme 5.3 (referente à Figura 5.14) – *Formação de um citoplasto e de uma célula binucleada.* Seguir a célula central. A célula divide-se ficando os dois núcleos na célula da esquerda. À direita fica o citoplasto. A célula binucleada move-se e acaba por sair do plano de foco.

Filme 5.4A e 5.4B (referente à Figura 5.20) – *A depleção de hsMob4(A&B) induz mobilidade celular.* Após a divisão as células permanecem ligadas e movimentam-se pelo campo de visão. De notar as pontes intercelulares muito longas.

Filme 5.5 – *As células controlo não apresentam movimento celular.* Observam-se várias células em mitose que se afastam ligeiramente, formando pequenas pontes intercelulares, e que não têm mobilidade.

6. Análise dos efeitos de sobreexpressão de hsMob4A e hsMob4B

A análise dos efeitos da sobreexpressão de uma proteína constitui uma forma de complementar informações acerca da sua função. Por exemplo, a sobreexpressão em células humanas de algumas das proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular (e.g. Polo e Aurora), induz instabilidade genómica e tumoregenicidade das células.

6.1 Imunofluorescência em células fixas

6.1.1 Progressão do ciclo celular após sobreexpressão de hsMob4A ou hsMob4B

Numa primeira análise, começou-se por tentar perceber se a sobreexpressão de hsMob4A ou de hsMob4B afectaria a progressão do ciclo celular. Para tal, estas proteínas foram sobreexpressas em células HeLa sob a forma de proteínas de fusão YFP.hsMob4A e YFP.hsMob4B.

Como se pode observar na figura 6.1A, a sobreexpressão de YFP.hsMob4A e de YFP.hsMob4B induz morte celular nestas células. O número de células fluorescentes, e portanto, a expressarem as proteínas de fusão, reduz significativamente com a sobreexpressão de ambas as proteínas. No controlo (células a expressar YFP) observa-se um constante aumento do número de células fluorescentes, uma vez que a expressão de YFP não afecta a viabilidade celular. Observou-se que nos poços em que se sobreexpressa YFP.hsMob4A ou YFP.hsMob4B, existem bastantes células soltas em suspensão, com uma morfologia esférica e irregular (enrugada), sugerindo morte celular. Este tipo de células, quase não se observava nos poços controlo. Para garantir que estas células soltas estavam de facto mortas ou a morrer, removeram-se por lavagem, e voltou-se a semear novamente em cultura. Ao fim de 6 dias, contaram-se novamente as células fluorescentes resultantes desses sobrenadantes. No entanto, praticamente não se observaram células vivas, pelo que se pode concluir que as células removidas nas lavagens são inviáveis. Estes resultados permitem concluir que a sobreexpressão de YFP.hsMob4A e de YFP.hsMob4B em células HeLa causa inviabilidade celular.

A mesma experiência, quando realizada em outra linha celular, células Hep-2, resulta num efeito semelhante (figura 6.1B). Pode-se pois concluir que a sobreexpressão de YFP.hsMob4A e YFP.hsMob4B causa morte celular, tanto em células HeLa, como em células Hep2.

Poder-se-ia levantar a questão da possibilidade de ser a sobreexpressão das proteínas de fusão a causa da morte celular, e não o facto das proteínas hsMob4A e hsMob4B por si só, sem estarem em fusão com a YFP, induzirem a morte das células. Para responder a essa questão sobreexpressaram-se as proteínas hsMob4A e hsMob4B a partir do vector pcDNA3.1 (que tem o promotor de CMV e não produz epítomos associados à

proteína produzida). Designou-se de dCF48 o clone que contém a sequência codificante de hsMob4A no vector pcDNA3.1, e de dCF47 o clone que contém a sequência codificante de hsMob4B nesse vector (ver apêndice 3).

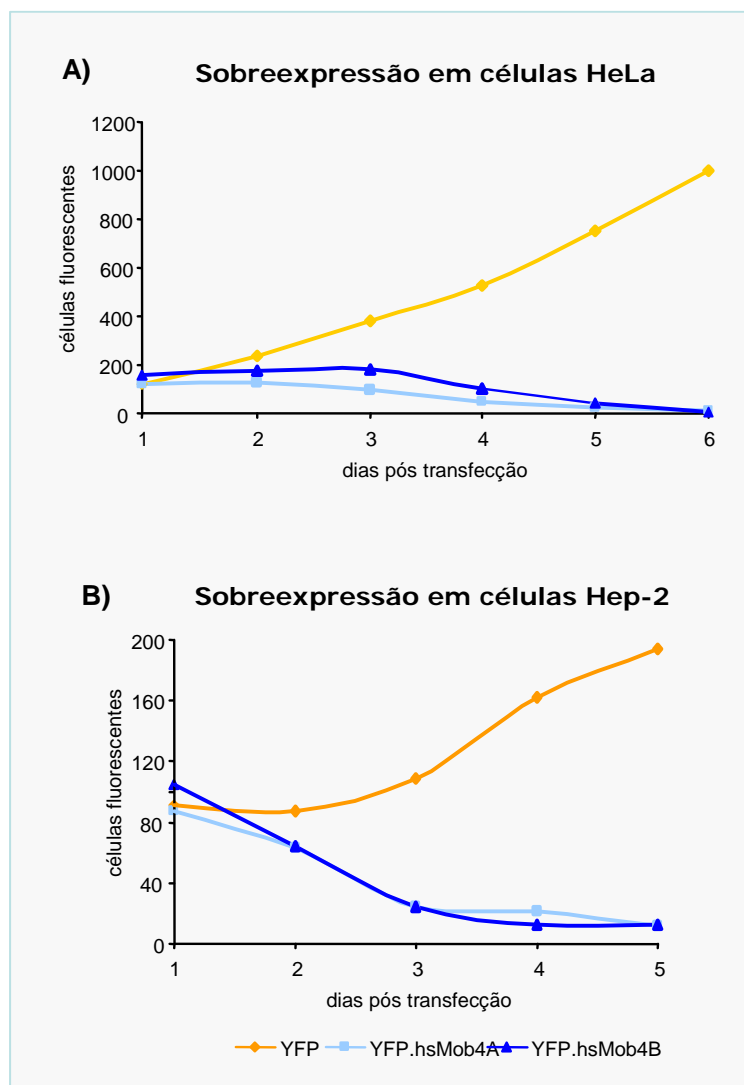


Figura 6.1 – Proliferação de células a sobreexpressar YFP.hsMob4A e YFP.hsMob4B. As células foram transfectadas com 1 μ g de DNA. Após transfecção, contou-se durante 6 dias o numero de células fluorescentes (sempre na mesma zona da placa de cultura de células). **A)** Gráfico representativo de uma de três experiências independentes realizadas em células HeLa **B)** Gráfico representativo de uma das duas experiências independentes realizadas em células Hep-2.

De modo a identificarem-se as células transfectadas, foram realizadas transfecções duplas de: dCF48 com pEYFPC1, dCF47 com pEYFPC1 e por último de pcDNA3.1 com pEYFPC1 (controlo). As transfecções foram realizadas na razão de 2:1 (por cada 2 μ g de dCF48 ou dCF47 utilizou-se simultaneamente 1 μ g de vector pEYFPC1). Assim, as células

fluorescentes (transfectadas com pEYFPC1) deveriam também (muito provavelmente) estar transfectadas com pcDNA3.1.

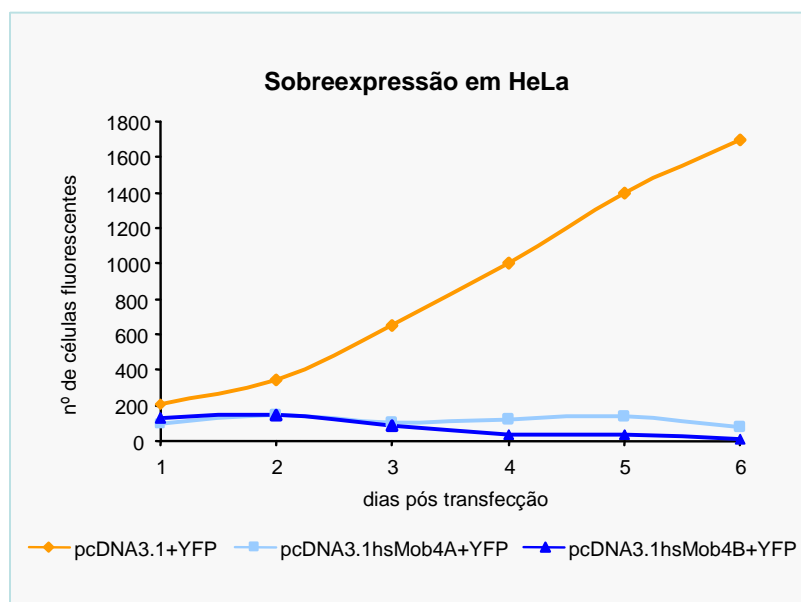


Figura 6.2 – Proliferação de células HeLa quando sobreexpressam *hsMob4A* e *hsMob4B*. As células foram transfectadas com 1 µg de DNA. Após transfecção contam-se as células fluorescentes durante de 6 dias (sempre na mesma zona da placa de cultura de células). (Gráfico representativo de uma de duas experiências independentes realizadas, onde se fez dois duplicados por experiência).

Como se pode observar na figura 6.2, as células controlo (transfectadas com pEYFPC1 e pcDNA3.1) não apresentam problemas de viabilidade celular. No entanto, os resultados da sobreexpressão de *hsMob4A* e de *hsMob4B* são completamente diferentes. Mais uma vez, a sobreexpressão de *hsMob4A* e *hsMob4B* parece causar morte celular, tal como no caso da sobreexpressão das proteínas de fusão. Uma análise detalhada parece no entanto, sugerir ligeiras diferenças nos efeitos causados pela sobreexpressão de *hsMob4A* ou de *hsMob4B*. A sobreexpressão de *hsMob4B* tem um efeito forte, causando morte celular a um ritmo semelhante ao observado para a sobreexpressão de YFP.hsmo4B, ao passo que a sobreexpressão de *hsMob4A* tem um efeito mais “suave”. Neste caso, a população de células fluorescentes mantém-se estática. Há no entanto, muitas células fluorescentes mortas no meio, o que indica que a população de células fluorescentes contada (que é a aderente) se renova. Os resultados apontam assim para uma morte celular causada pela sobreexpressão de *hsMob4A*, mas a um ritmo mais lento do que a morte celular causada pela sobreexpressão de *hsMob4B*.

Em resumo, as experiências apresentadas permitem concluir que a sobreexpressão de *hsMob4A* e de *hsMob4B* causam morte celular, e ainda que *hsMob4B* parece provocar um fenótipo mais agressivo do que *hsMob4A*.

6.1.2 Fenótipo causado pela sobreexpressão de hsMob4A e hsMob4B

De modo a fazer uma análise mais detelhada do fenótipo causado pela sobreexpressão de hsMob4A e de hsMob4B em células HeLa, observaram-se estas células por imunofluorescência. Os resultados apresentados são uma média de duas experiências independentes, em que se analisaram 600 células transfectadas por experiência.

Imediatamente após o início da sobreexpressão (dia 1), muitas células apresentam o DNA muito condensado e fragmentado (figura 6.3A) que, segundo Spector *et. al*, 1998, devem corresponder a células apoptóticas. As células apoptóticas apresentam geralmente uma morfologia e comportamento característicos, com condensação do núcleo, seguida de fragmentação do DNA, após o que as células mirram e soltam-se do suporte. Algumas células, que ainda não tinham o DNA condensado ou fragmentado, pareciam ter os núcleos *rebentados*. Estas no entanto, não foram consideradas como apoptóticas, mas possivelmente iriam tornar-se inviáveis (Figura 6.3B). Neste trabalho, observou-se que o número destas células apoptóticas aumentava com o tempo de sobreexpressão até que, ao fim de 4 dias, o número de células apoptóticas era, no caso de YFP.hsMob4A, 8.1 vezes superior ao do controlo, e no caso de YFP.hsMob4B, 9.8 vezes superior ao controlo (figura 6.4, tabela 6.1).

É importante salientar que, antes da fixação para imunofluorescência, as células foram lavadas com tampão PEM. Assim, tal como nas experiências descritas anteriormente (figuras 6.1 e 6.2), a maioria das células em suspensão, é removida com a lavagem. Por esta razão, a percentagem de apoptose indicada deverá ser muito superior, pois apenas se contabilizaram células apoptóticas ainda aderentes.

Confirma-se assim que a sobreexpressão de hsMob4A ou de hsMob4B mata as células. A análise por microscopia sugere ainda que a morte celular se deve a um mecanismo de apoptose.

Um outro resultado significativo obtido foi o aumento detectado no número de células binucleadas (figura 6.5). Neste estudo, considerou-se uma célula binucleada aquela que possui dois núcleos claramente separados, ou que, embora não se observando uma completa resolução dos núcleos, tenha constrições na morfologia nuclear. Pensa-se que quando células binucleadas apresentam os núcleos completamente individualizados, num citoplasma comum, são resultantes de uma divisão na qual a citocinese não foi correctamente executada. As células com constrições na morfologia nuclear resultam provavelmente de problemas durante a execução da cariocinese (a correcta segregação do DNA). Ambos os casos são detectados aquando da sobreexpressão de Mob4.

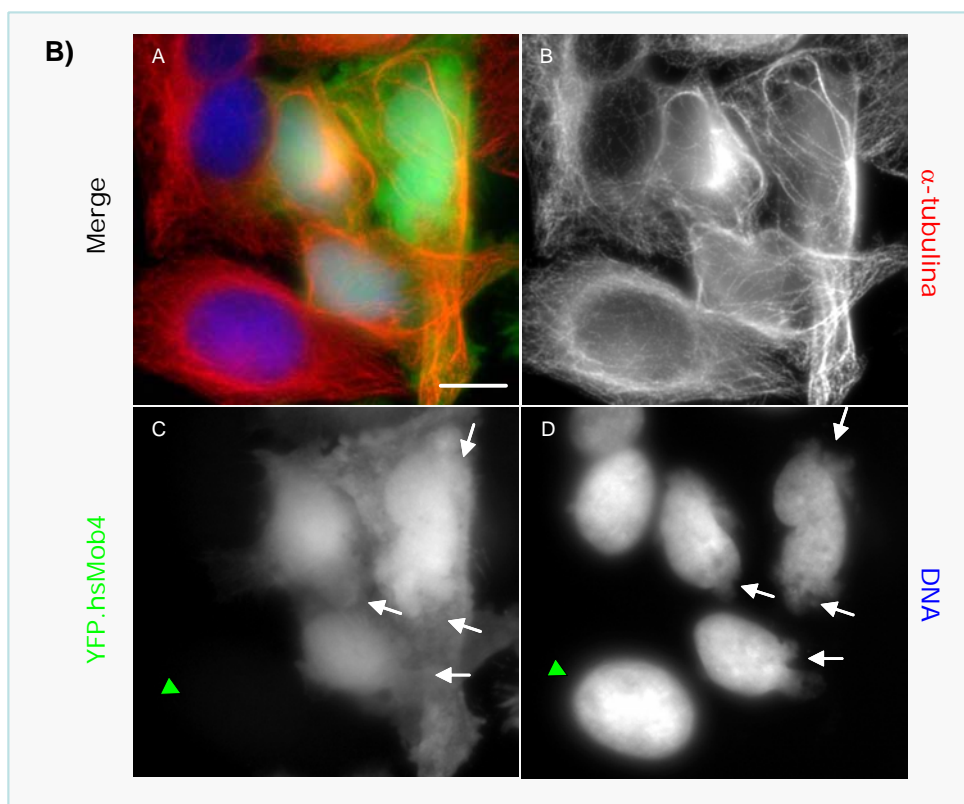
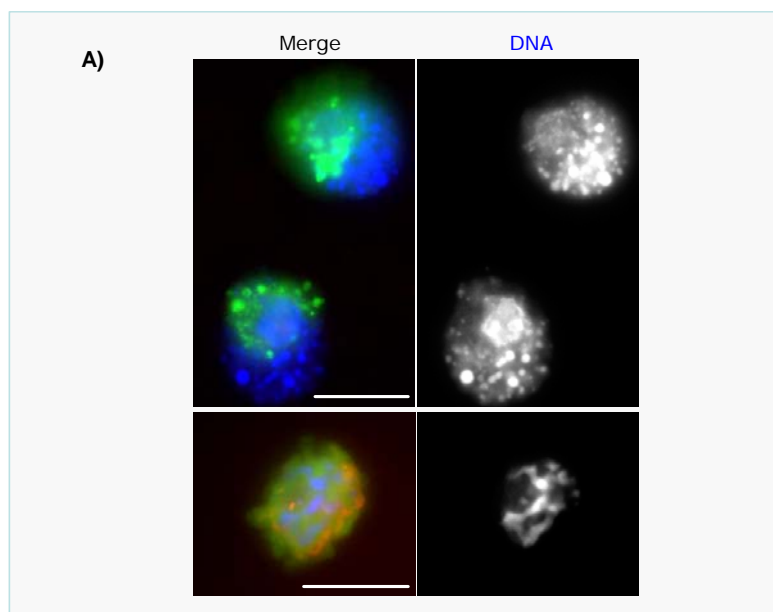


Figura 6.3 – A sobreexpressão de *hsMob4A* e de *hsMob4B* induz apoptose. As células foram transfectadas com pEYFPC1, dCF41¹ e dC37². **A)** Apresentam-se dois exemplos do que se considerou serem células apoptóticas. **B)** Células com lise nuclear (setas). Células com este fenótipo não foram consideradas como apoptóticas no entanto, deverão também ser inviáveis. A cabeça de seta indica uma célula com núcleo normal (e sem sobreexpressão). (Barra de escala -10 μ m)

¹ dCF41 – Clonou-se a região codificante de *hsMob4A* em pEYFPC1 (ver apêndice 3).

² dCF37 - Clonou-se a região codificante de *hsMob4A* em pEYFPC1 (ver apêndice 3).

Desta forma, a sobreexpressão de hsMob4A e de hsMob4B parece interferir numa correcta segregação do DNA, assim como na execução da citocinese. Nos controlos detectou-se menos de 1% de células com contrações na morfologia nuclear.

	1	2	3	4
YFP	1.7 ± 0.41	0.7 ± 0.3	2.3 ± 1.0	1.6 ± 0.5
YFP.hsMob4A	5 ± 0.7	6.7 ± 0.4	10.5 ± 2.8	12.9 ± 3.1
YFP.hsMob4B	7.8 ± 0.4	8.4 ± 0.3	6.7 ± 0.3	15.5 ± 2.6

Tabela 6.1 – A sobreexpressão de *hsMob4A* e de *hsMob4B* induz apoptose. Apresenta-se a percentagem de células apoptóticas observadas durante os 4 dias que durou a experiência. Resultados de duas experiências independentes onde se contaram 450 a 600 células por experiência. (Ver também figura 6.4)

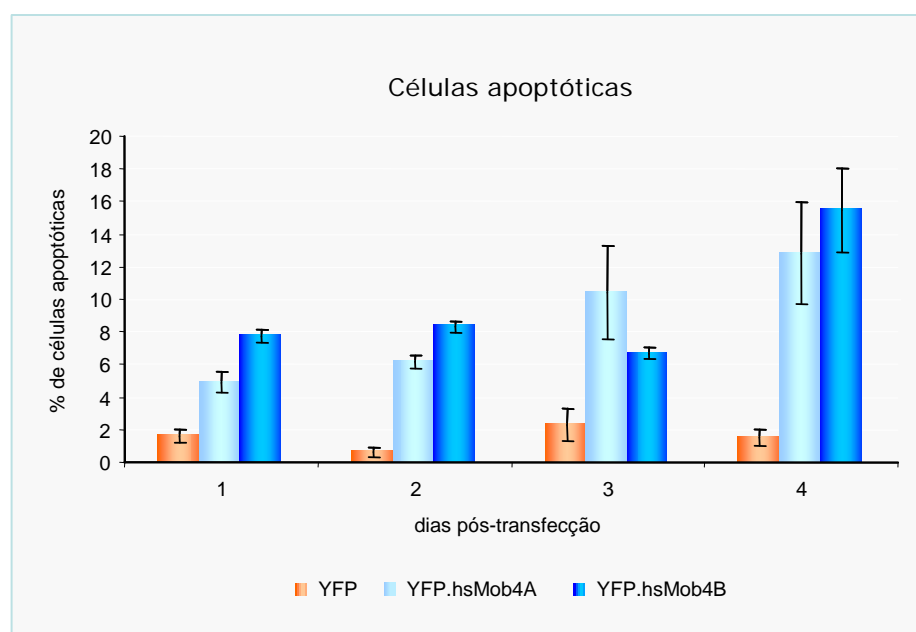


Figura 6.4 – A sobreexpressão de *hsMob4A* e de *hsMob4B* induz apoptose. Apresenta-se a percentagem de células apoptóticas observadas durante os 4 dias que durou a experiência. Resultados de duas experiências independentes onde se contaram 450 a 600 células por experiência. (Ver também tabela 6.1)

A sobreexpressão de hsMob4A e de hsMob4B resulta num aumento de quase 6 vezes nas células binucleadas, face ao controlo (figura 6.6). Muito significativamente, e apesar do aumento de células binucleadas se verificar imediatamente um dia pós transfecção, nunca se observou qualquer aumento no número de células tetranucleadas (ou mais) o que é, uma vez mais, sugestivo da ocorrência de morte celular provocada pela sobreexpressão das hsMob4. Assim, é possível que as células possam falhar a divisão, ficando binucleadas e, ou não têm capacidade de continuar o ciclo, ou entram em apoptose, nunca chegando por isso a formar células tetranucleadas.

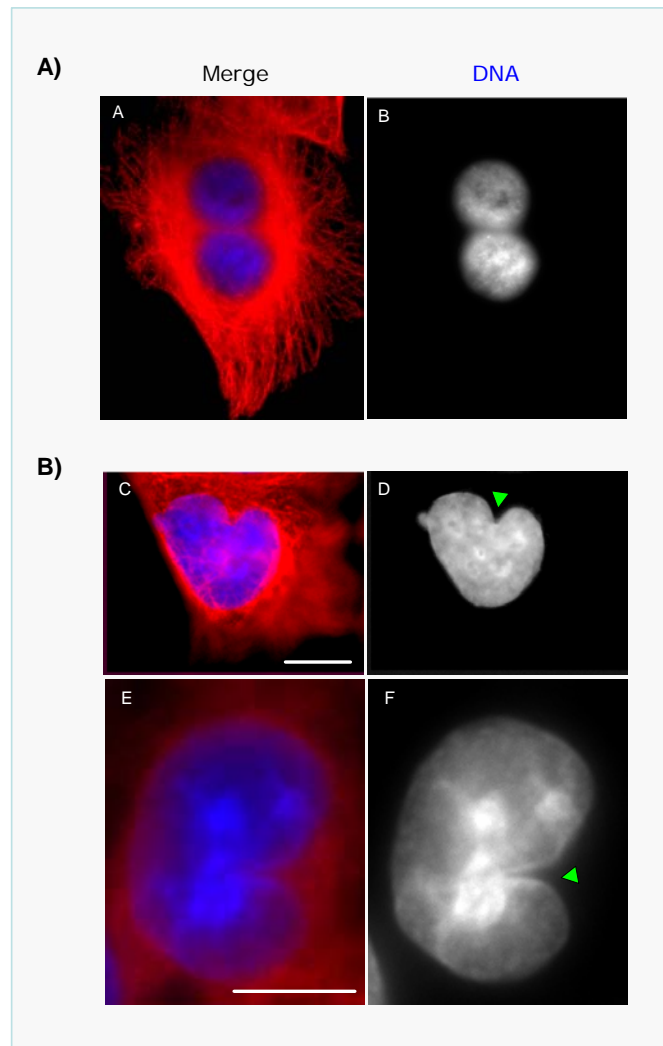


Figura 6.5 – A sobreexpressão de *hsMob4A* e de *hsMob4B* provoca um aumento no número de células binucleadas. Tipo de células binucleadas observadas: **A)** Células com dois núcleos **B)** Células com constrições na morfologia nuclear. Estes dois tipos de célula foram detectados em igual proporção. (A barra de escala representa 10 μ m). Azul – DNA, vermelho - α -tubulina.

Detectaram-se ainda outros fenótipos causados pela sobreexpressão de *hsMob4A* ou de *hsMob4B* que, embora mais raros, permitem também detectar defeitos na correcta execução da citocinese.

Na figura 6.7A, apresenta-se uma célula com microtúbulos numa distribuição característica de telofase. No entanto, para ser uma telofase normal, ligada à estrutura que parece ser o midbody (indicada com seta), deveria estar uma outra célula filha. Haverá pelo menos duas hipóteses que expliquem este resultado: a sobreexpressão de *hsMob4* pode alterar a estabilidade dos microtúbulos, ou as células fazem a citocinese sem segregar o DNA. Se a sobreexpressão de *hsMob4* alterar a estabilidade dos microtúbulos, estes podem estar mais fracos, e a figura pode ser apenas um resultado da manipulação das lamelas. Por outro lado, se houver problemas de segregação dos cromossomas, a célula poderá

tentar segregar os cromossomas e, não conseguindo, prossegue para telofase sem fazer anafase, dando origem a esta figura.

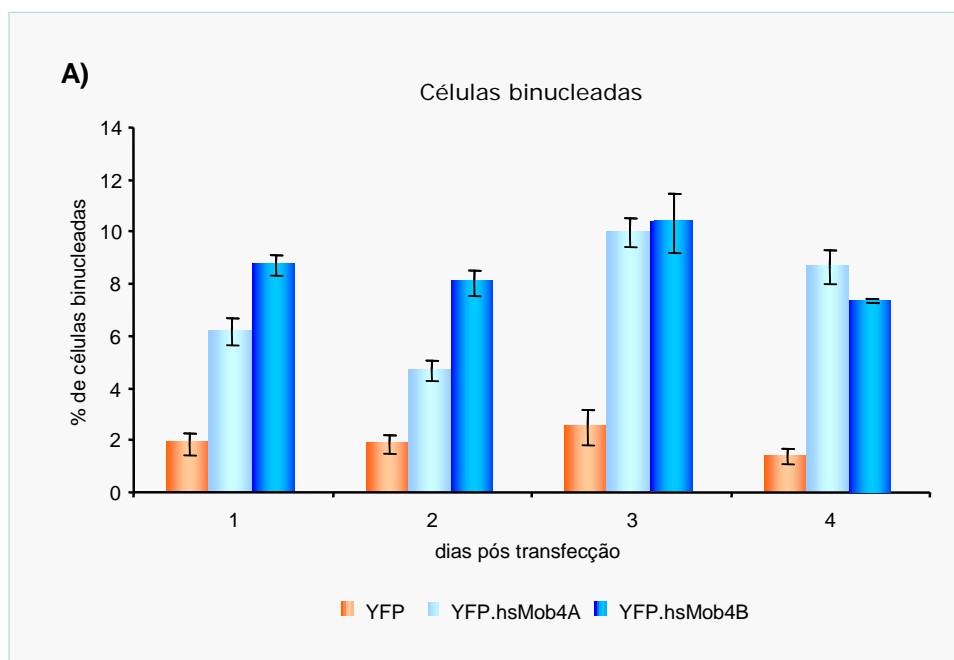


Figura 6.6 – A sobreexpressão de *hsMob4A* e de *hsMob4B* provoca um aumento no número de células binucleadas. Resultados de duas experiências independentes onde se contaram 450 a 600 células por experiência.

Na figura 6.7B, observa-se uma célula em divisão (ver painel H), mas em que os dois núcleos estão numa mesma célula filha (2N), sendo que a outra não tem DNA (0N) (citoplasto). Experiências preliminares realizadas em células 3T3 permitiram igualmente detectar problemas de citocinese, como os descritos em HeLa.

Em resumo, a sobreexpressão, tanto de *hsMob4A* como de *hsMob4B*, causa morte celular, aparentemente por apoptose, e um aumento do número de células binucleadas. Este aumento de células binucleadas será possivelmente devido a erros na execução da citocinese.

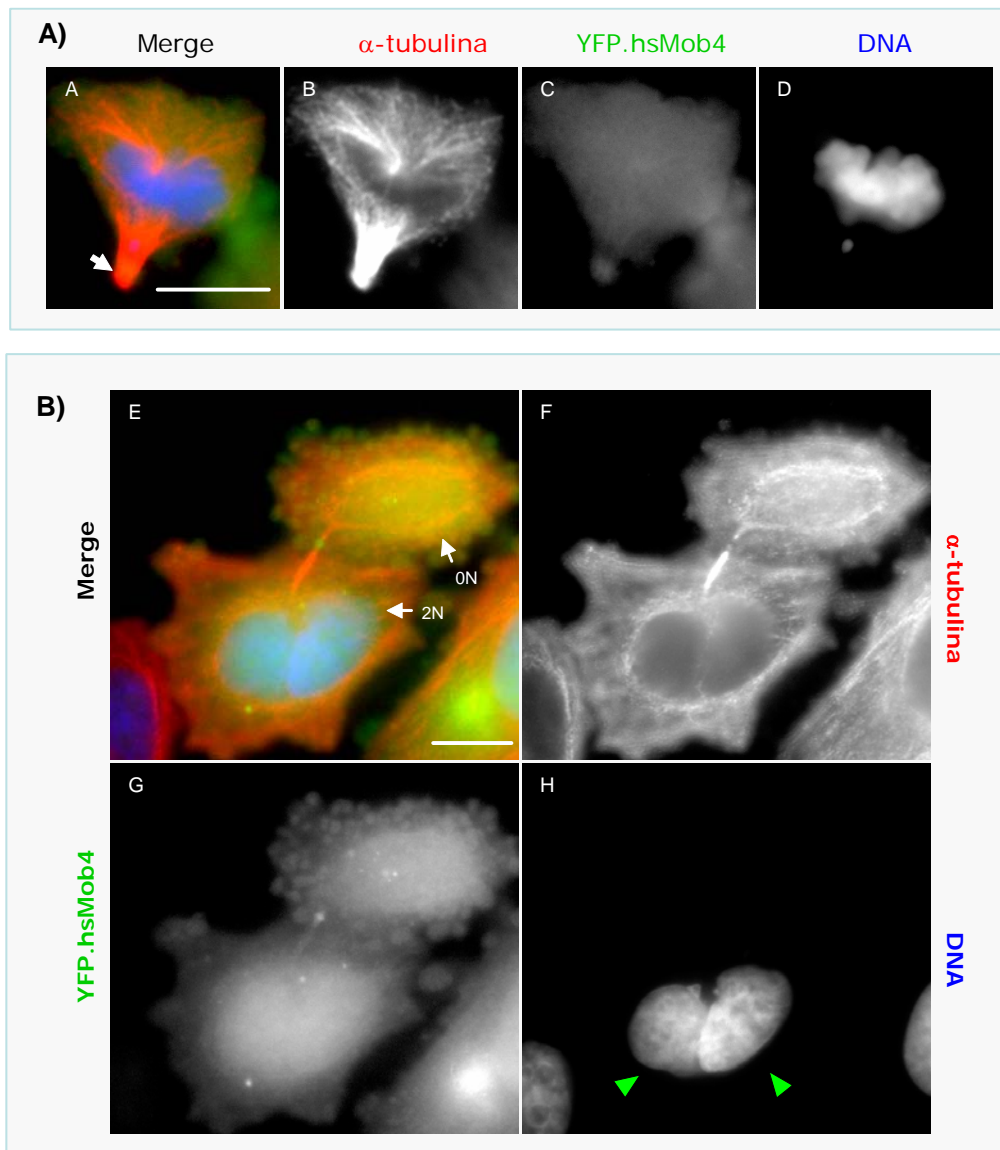


Figura 6.7 – A sobreexpressão de *hsMob4A* e de *hsMob4B* provoca defeitos de citocinese. **A**) A seta indica o local de constricção (midbody ?) mas não ligado a outra célula. **B**) Célula Hela binucleada (2N) unida pelo midbody a um citoplasto (0N). A constricção é visível na marcação com tubulina e as setas a verde indicam os dois núcleos. (A barra de escala representa 10 μ m)

6.1.3 Efeitos da sobreexpressão nos centríolos

Como se apresentou no terceiro capítulo de resultados, a depleção simultânea de HsMob4(A&B) por RNAi resulta numa separação de centríolos. Tendo em mente esse resultado, questioná-mo-nos se a sobreexpressão destas proteínas poderia impedir a separação dos centríolos em telofase. Para a realização dessa experiência, foram transfectadas células HeLa-centrina com os clones dCF48 ou dCF47, ou ainda com pcDNA3.1 (como controlo). Procedeu-se à fixação destas células dois dias após a transfecção, corou-se o DNA por coloração com DAPI, os centrossomas foram marcados

por imunolocalização com a γ -tubulina e os centríolos identificados pela centrina.GFP. Analisaram-se, por cada experiência, 50 a 70 células em telofase tardia ligadas por uma ponte intercelular. Como se pode ver pela análise da figura 6.8, após a sobreexpressão de hsMob4A e de hsMob4B a característica separação dos centríolos de telofase encontra-se severamente comprometida (figura 6.8).

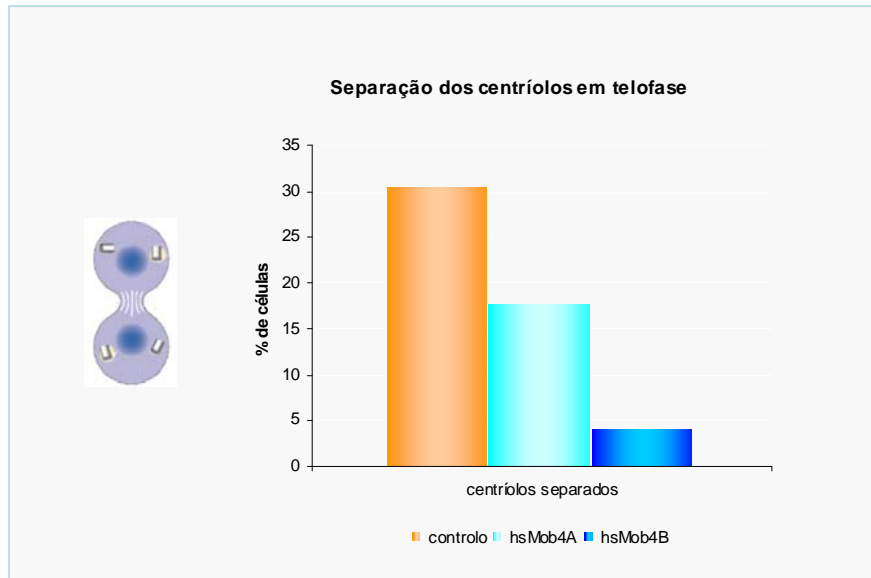


Figura 6.8 – A sobreexpressão de *hsMob4A* ou de *hsMob4B* impede a separação dos centríolos no final de telofase.

6.1.4 Efeitos nos centrossomas

Tentou-se perceber se a expressão ectópica de qualquer das hsMob4 afectaria a estrutura dos centrossomas. Estes ensaios tiveram que ser realizados segundo novas condições. Nos ensaios descritos até então, as células a sobreexpressar Mob4 eram identificadas por co-transfecção com um vector com o gene YFP. No entanto, ao fixar-se as células com formaldeído, perdia-se a marcação da γ -tubulina. A imunolocalização da γ -tubulina era recuperada se, antes de se fixar as células com formaldeído se realizasse uma pré extracção com Triton-X100, durante 1 minuto. No entanto, esta pré-extracção, tem por seu lado como resultado a perda do sinal de YFP, porque esta proteína é solúvel.

Por estas razões, utilizou-se o clone de RFP.hsMob4A, e as células foram fixas com metanol. Desta forma, conseguiu-se identificar as células transfectadas e detectar a γ -tubulina. Os ensaios foram realizados em células 3T3. Nesta células, a expressão dirigida pelo promotor CMV (que é o promotor do vector onde está o RFP-Mob4) é mais fraca do

que em células HeLa. Como a RFP forma tetrameros, induzindo o rebentamento das células quando em níveis elevados, o recurso às células 3T3 resolveu parcialmente o problema.

Na figura 6.9 apresentam-se alguns dos defeitos mais observados neste tipo de experiência. Nos painéis A-D, apresenta-se uma célula transfectada na qual se observa uma grande acumulação de γ -tubulina (seta laranja), coincidente com um grande aglomerado de hsMob4A (seta laranja). No entanto, este aglomerado não co-localiza com a marcação da γ -tubulina (seta azul), e portanto, com o centróssoma. Na zona do centróssoma é possível observar aglomerados de RFP.hsMob4A, mas estes não são totalmente sobreponíveis com o centróssoma (setas azuis).

Nos painéis E-F, observa-se também um agregado grande de γ -tubulina, mas aqui coincidente com hsMob4A (setas laranja). No entanto, nesta célula é difícil identificar os centróssomas, podendo estes ser o que se indica no painel F com a seta azul. Mas a ser assim, o recrutamento da γ -tubulina para este organelo parece menor do que o normal. É de notar que não se observa co-localização de RFP.hsMob4A com a γ -tubulina que pensamos estar no centróssoma (setas azuis).

Finalmente, apresenta-se uma outra célula que possui a γ -tubulina dispersa pelo citoplasma, não sendo possível a identificação correcta do centróssoma (painel L). No entanto, são claramente visíveis diversos agregados de RFP.hsMob4 (painel J, setas verdes).

Em aproximadamente 80% dos casos observados detectou-se que os grandes aglomerados de RFP.hsMob4A co-localizam com a γ -tubulina. Esta, por sua vez, encontra-se aglomerada em estruturas de dimensões muito superiores ao normal. Nos restantes 20% não se observou co-localização dos aglomerados de RFP.hsMob4A com a γ -tubulina, observando-se grandes aglomerados de RFP.hsMob4A e estando a γ -tubulina dispersa no citoplasma da célula. É interessante notar que, nas células em que a expressão de RFP.hsMob4A era mais elevada não se observou a γ -tubulina organizada (isto é, não era possível identificar centróssomas). Em todas as células não transfectadas, a imunomarcação da γ -tubulina revelou sempre um ou dois centróssomas aparentemente normais, não sendo nunca visíveis grandes agregados de γ -tubulina.

Em resumo, a sobreexpressão de hsMob4 parece causar uma aglomeração de γ -tubulina em conjunto com aglomerados de hsMob4. Em outros casos de elevada expressão de RFP.hsMob4A parece ocorrer uma diminuição do recrutamento de γ -tubulina para os centróssomas.

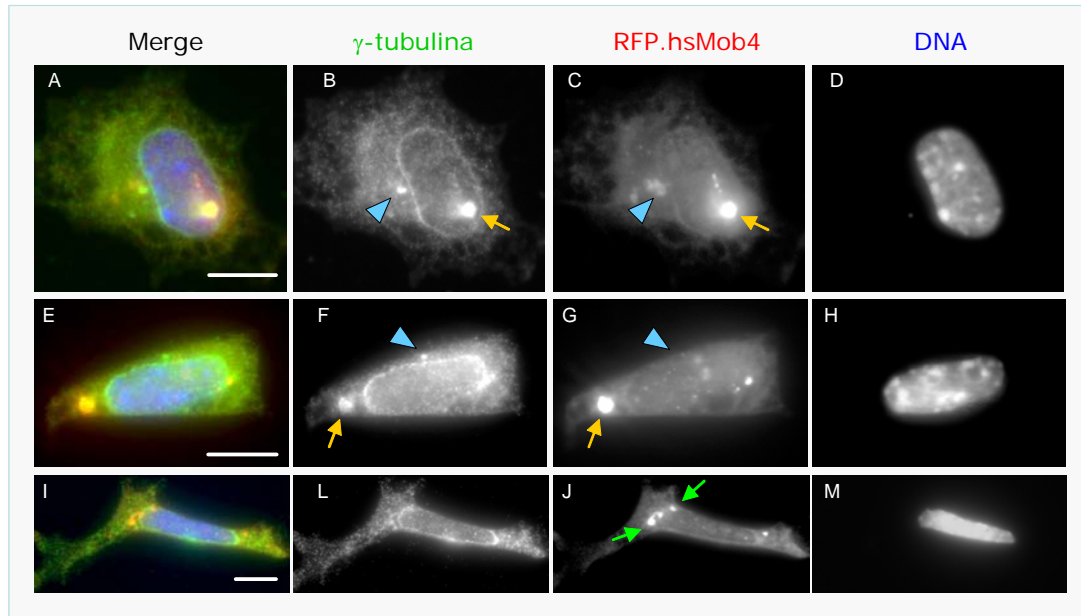


Figura 6.9 – A sobreexpressão de *hsMob4A* e de *hsMob4B* parece provocar defeitos no recrutamento de γ -tubulina para os centrosomas em células 3T3. A seta azul indica a localização de centrosomas, a seta laranja de grandes agregados conjuntos de RFP-Mob4 e γ -tubulina, e as setas verdes de agregados de RFP-Mob4 sem acumulação de γ -tubulina. (A barra de escala representa 10 μ m)

6.1.5 - Ensaios de renucleação de microtúbulos

Os resultados obtidos, tanto por RNAi como por expressão ectópica dos *hsMob4*, sugerem uma função das *hsMob4* associada aos centrosomas/centríolos. Decidiu-se portanto, determinar se a sobreexpressão de *hsMob4* influenciaria a nucleação dos microtúbulos a partir dos centrosomas *in vivo*. O ensaio escolhido para tal consiste na despolimerização dos microtúbulos a frio (incubando as células a 0°C), seguida de renucleação destes por incubação das células novamente a 37°C. Nestes casos, observa-se o aparecimento de uma rede ordenada de microtúbulos a crescer de um centro de nucleação comum (o centrosoma). Os ensaios de renucleação foram realizados em células HeLa com expressão ectópica de *hsMob4A* ou *hsMob4B* a partir do vector pcDNA3.1. Como controlo, foram utilizadas células não transfectadas e células transfectadas com o vector sem a região codificante de uma proteína. Para despolimerizar os microtúbulos, as células foram tratadas por uma de duas formas diferentes: uma incubação de 30 minutos no gelo, ou uma incubação de 40 minutos no gelo na presença de 5 μ M de nocodazole.

Antes do tratamento para despolimerização dos microtúbulos não se observaram, por imunofluorescência com anticorpo anti β -tubulina, diferenças na rede destes filamentos entre células controlo e células a expressarem ectopicamente *hsMob4A* ou *hsMob4B* (figura 6.10A).

Após o tratamento de 30 minutos em gelo, tanto as células controlo como as células com sobreexpressão de *hsMob4B* apresentavam os microtúbulos totalmente

despolimerizados (figura 6.10B, painéis D e F) sendo apenas detectáveis os centrossomas. No entanto, as células a sobreexpressarem hsMob4A apresentavam ainda uma rede de microtúbulos bastante definida (figura 6.10B, painel E).

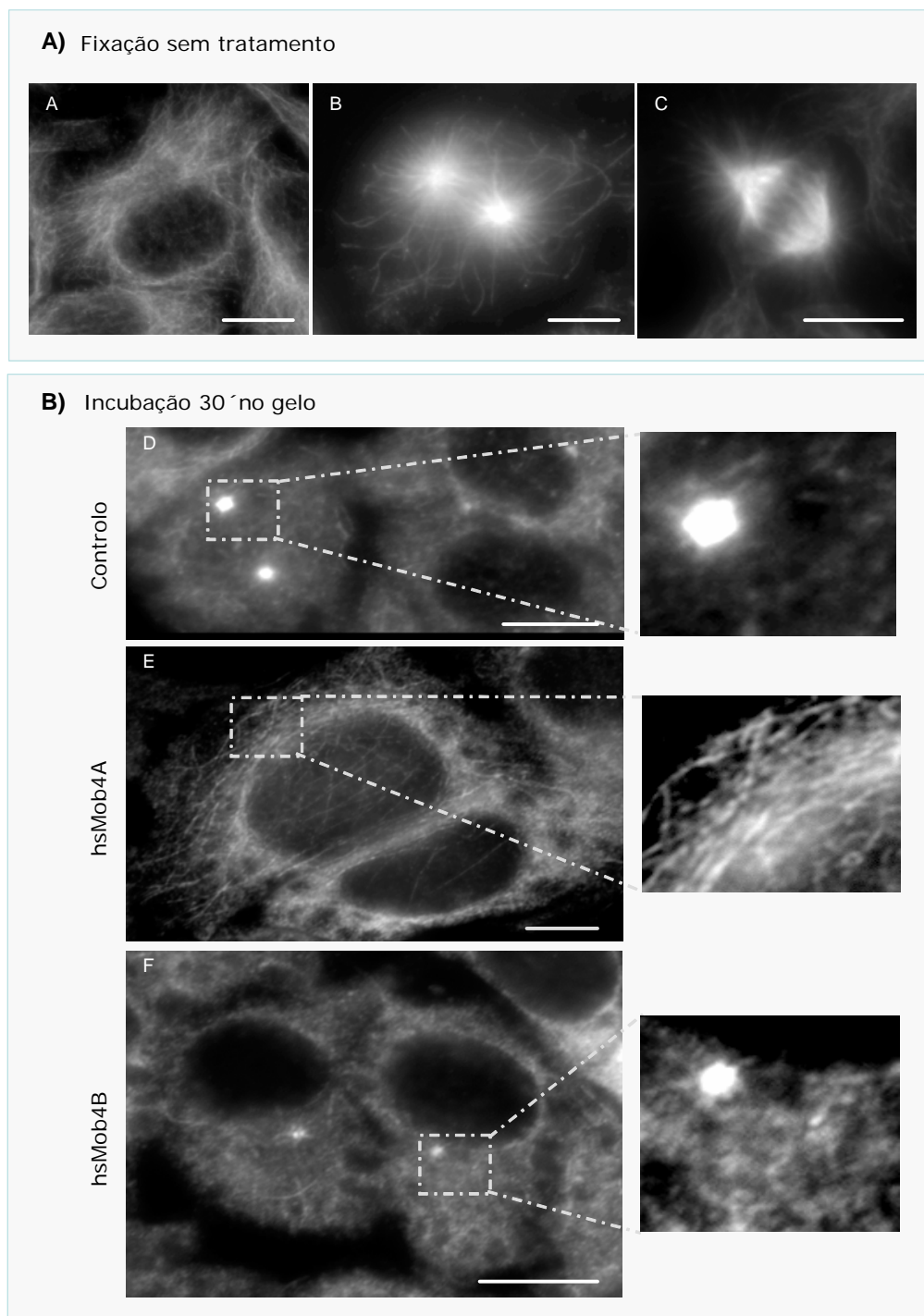


Figura 6.10 – A sobreexpressão de hsMob4A aumenta a estabilidade dos microtúbulos. **A)** Células HeLa não tratadas e os microtúbulos detectados. Como se pode observar os microtúbulos estão normais (A-interfase, B-prometáfase, C-metáfase). **B)** Células incubadas 30 minutos em gelo antes da fixação. As células nos painéis E e F estavam a sobreexpressar hsMob4A e Mob4B, respectivamente. (A barra de escala representa 10 μm)

Mesmo com o tratamento mais agressivo (40 minutos em gelo numa solução com 5 μ m de nocodazole), as células a sobreexpressar hsMob4A apresentam ainda alguns microtúbulos bem definidos (figura 6.11A, painel B). O nocodazole é um agente despolimerizador de microtúbulos e esperava-se assim, despolimerizar todos os microtúbulos da célula, mesmo os mais estáveis (Piel *et al.*, 2000). Como se pode observar (figura 6.11A, painéis A e C) as células controlo e transfectadas com hsMob4B tratadas deste modo apresentam os microtúbulos completamente despolimerizados. Estes ensaios sugerem que a sobreexpressão de hsMob4A aumenta a estabilidade dos microtúbulos, mas que o mesmo não se verifica com a sobreexpressão de hsMob4B. Estes resultados são mais uma indicação que as proteínas hsMob4A e hsMob4B poderão ter funções celulares ligeiramente diferentes.

Determinou-se então a capacidade de renucleação de microtúbulos nestas células, após o tratamento a frio e com nocodazole. Um minuto após lavagem do nocodazole e passagem para 37°C, observou-se nas células controlo o início da nucleação de microtúbulos a partir do centrossoma (figura 6.11B, painel D). Em células com expressão ectópica de hsMob4B, observou-se também um início de nucleação de microtúbulos, mas nem todos pareciam estar focados no centrossoma (figura 6.11B, painel F). Nas células a sobreexpressarem hsMob4A observou-se já uma forte nucleação de microtúbulos (figura 6.11B, painel E), muito superior ao controlo e às células a sobreexpressarem hsMob4B.

Após cinco minutos de re-nucleação a 37°C, as células controlo apresentavam uma rede de microtúbulos já bastante robusta e organizada a partir de um centro nucleador, que deverá ser o centrossoma (figura 6.11C, painel G). Por outro lado, tanto para as células a sobreexpressar de hsMob4A, como para as que sobreexpressam hsMob4B, era possível observar a formação de inúmeros centros de nucleação de microtúbulos (figura 6.11C, painel H e I).

Verificou-se assim que a sobreexpressão de hsMob4A e de hsMob4B interfere com a re-nucleação de microtúbulos e que além disso, a sobreexpressão de hsMob4A interfere com a estabilidade dos microtúbulos, aumentando-a e tornando-os mais resistentes a tratamentos despolimerizadores.

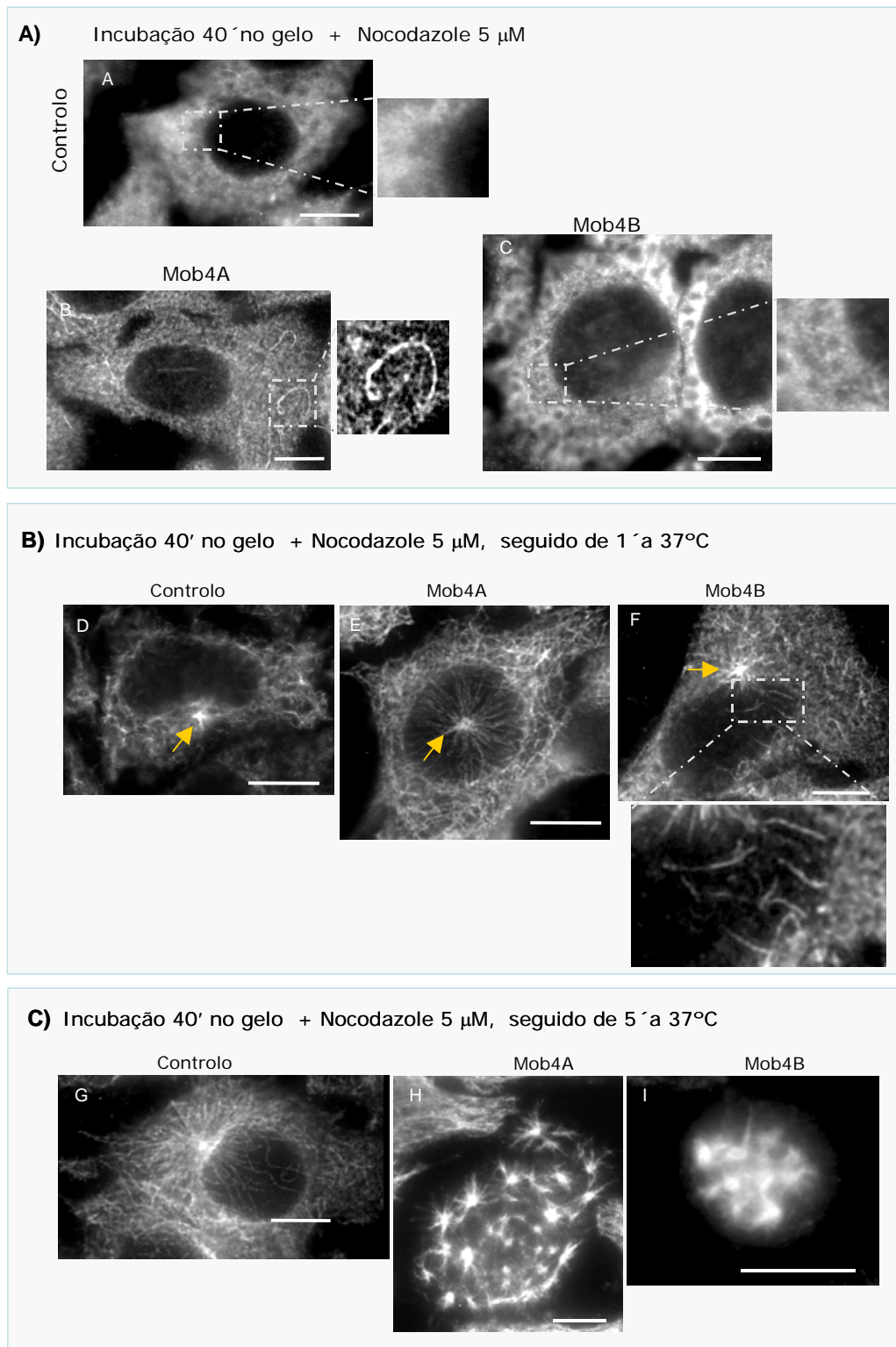


Figura 6-11 – A sobreexpressão de hsMob4 (A ou B) induz a formação de locais de nucleação de microtúbulos. As células HeLa foram transfectadas com dCF48, dCF47 ou pcDNA 3.1. Dois dias após transfecção, de forma a se despolimerizar os microtúbulos, incubaram-se as células 40' em gelo em meio com 5 μ M de nocodazole. Permitiu-se a re-nucleação de microtúbulos durante 0min (**A**), 1min (**B**), e 5min (**C**) antes da fixação e detecção de microtúbulos. (A barra de escala representa 10 μ m)

6.2 Efeitos de sobreexpressão em microscopia de tempo real

Com o objectivo de estudar a dinâmica dos efeitos de sobreexpressão, fez-se a análise do comportamento das células com expressão ectópica de hsMob4A ou de hsMob4B por microscopia de tempo real. Como antes, a expressão ectópica da hsMob4A e da hsMob4B foi obtida a partir dos clones dCF48 e dCF47. Para se identificarem as células com expressão de hsMob4A e de hsMob4B, procedeu-se à co-transfecção das mesmas com o clone pEYFP_{tub} (clonetch), que expressa YFP- α -tubulina. Desta forma, para além de se detectar as células com sobreexpressão de hsMob4, é possível visualizar a dinâmica dos microtúbulos. De modo a garantir que todas as células que expressam YFP.tubulina sobreexpressam também hsMob4A ou hsMob4B, utilizou-se nas transfecções, uma razão de 1/3 da concentração pEYFP_{tub} /dCF48 ou pEYFP_{tub} /dCF47. Todas as células com expressão de YFP.tubulina e que iniciaram mitose foram analisadas e contabilizadas.

Começou-se por determinar o tempo de duração de cada fase da mitose nas células que sobreexpressam hsMob4A ou hsMob4B. Na tabela 6.2 apresentam-se os resultados de três experiências independentes, nas quais se analisaram 23 células controlo, 29 células hsMob4A e 25 células hsMob4B.

Observou-se que as células HeLa demoram entre 3 a 9 minutos, desde o alinhamento dos cromossomas na placa metafásica, até a segregação do DNA (início de anafase). Tendo em conta esse resultado, considerou-se um atraso ou paragem em metafase a permanência das células nesta fase por mais de 20 minutos. Impressionantemente, observou-se que as células a sobreexpressar hsMob4A permanecem, em média, 87,8 minutos em metafase. As células a sobreexpressar hsMob4B passam uma média de 27,2 minutos em metafase, enquanto que a média dos controlos é de 8,1 minutos (tabela 6.2). A metafase mais longa observada para o controlo foi de 26 minutos, ao passo que na sobreexpressão de hsMob4B foi de 68 minutos e 351 minutos na sobreexpressão de hsMob4A. Este bloqueio/paragem em metafase (durante mais de 20 minutos) foi observada na maioria das células que sobreexpressam hsMob4A (62,1%) (tabela 6.3). Na figura 6.12B apresenta-se um exemplo da paragem em metafase, observada numa célula a sobreexpressar hsMob4A. Esta célula esteve 141 minutos em metafase. No filme anexo (filme 6.1), pode também observar-se uma célula não transfectada, que demorou 4 minutos desde o alinhamento dos seu cromossomas até ao início de anafase (figura 6.12 A). Após a um longo espaço de tempo em metafase, as células pareciam seguir por mitose normalmente. No entanto, detectou-se que 17,2% destas acaba por morrer após a mitose.

Assim, o fenótipo principal observado na sobreexpressão de hsMob4A, foi de paragem em metafase.

A sobreexpressão de hsMob4B resulta também numa ligeira paragem em metafase (as células demoram em média 27,2 minutos em metafase).

	Controlo	hsMob4A	hsMob4B
Prometáfase	58,8	103,5	172.42
Metafase	8,06	87,8	27.25
Anáfase	15,1	16,8	22.9
Telófase	40,3	90,7	103,6

Tabela 6.2 – *Tempo de cada fase do ciclo celular em células a sobreexpressar hsMob4A ou hsMob4B.* As células HeLa foram sincronizadas com um duplo bloqueio com timidina. Analisaram-se apenas as células que passaram por mitose. Valores em minutos.

	Controlo	hsMob4A	hsMob4B
Entrada em apoptose	0	17,24	36
Paragem em metafase	4,3	62,07	4,5
Colapso do fuso	4,3	10,34	48
Agregação de α-tubulina	0	6,9	60
Segregação incorrecta do DNA	0	10,34	4
Constricção sem anáfase	0	6,9	0

Tabela 6.3 – *Defeitos mitóticos provocados pela sobreexpressão de hsMob4A ou hsMob4B.* Analisaram-se apenas as células que passaram por mitose. Valores em percentagem.

A sobreexpressão de hsMob4B tem no entanto outro efeito significativo: observou-se que, em 48% das células analisadas, os fusos mitóticos colapsam imediatamente a seguir ao desmontar da membrana nuclear (Figura 6.13 e filme 6.2). Este é um aumento especialmente significativo, tendo em conta os 4,3% observados nos controlos. Observou-se que, nas células com expressão ectópica de hsMob4B, ocorre a separação dos centróssomas, a quebra do envelope nuclear, mas o fuso não se forma e os centróssomas parecem cair/colapsar em direcção ao centro da célula (colapsar dos fusos, ver filme 6.2). As células permanecem então neste estado de “prometáfase” durante a duração do filme (entre 6 a 8 horas). É, muito provavelmente, devido a esse facto que se determinaram os 172 minutos em prometáfase nas células que sobreexpressam hsMob4B. O colapsar dos

fusos foi também observado nas células que sobreexpressam hsMob4A (em 10,4 % das células).

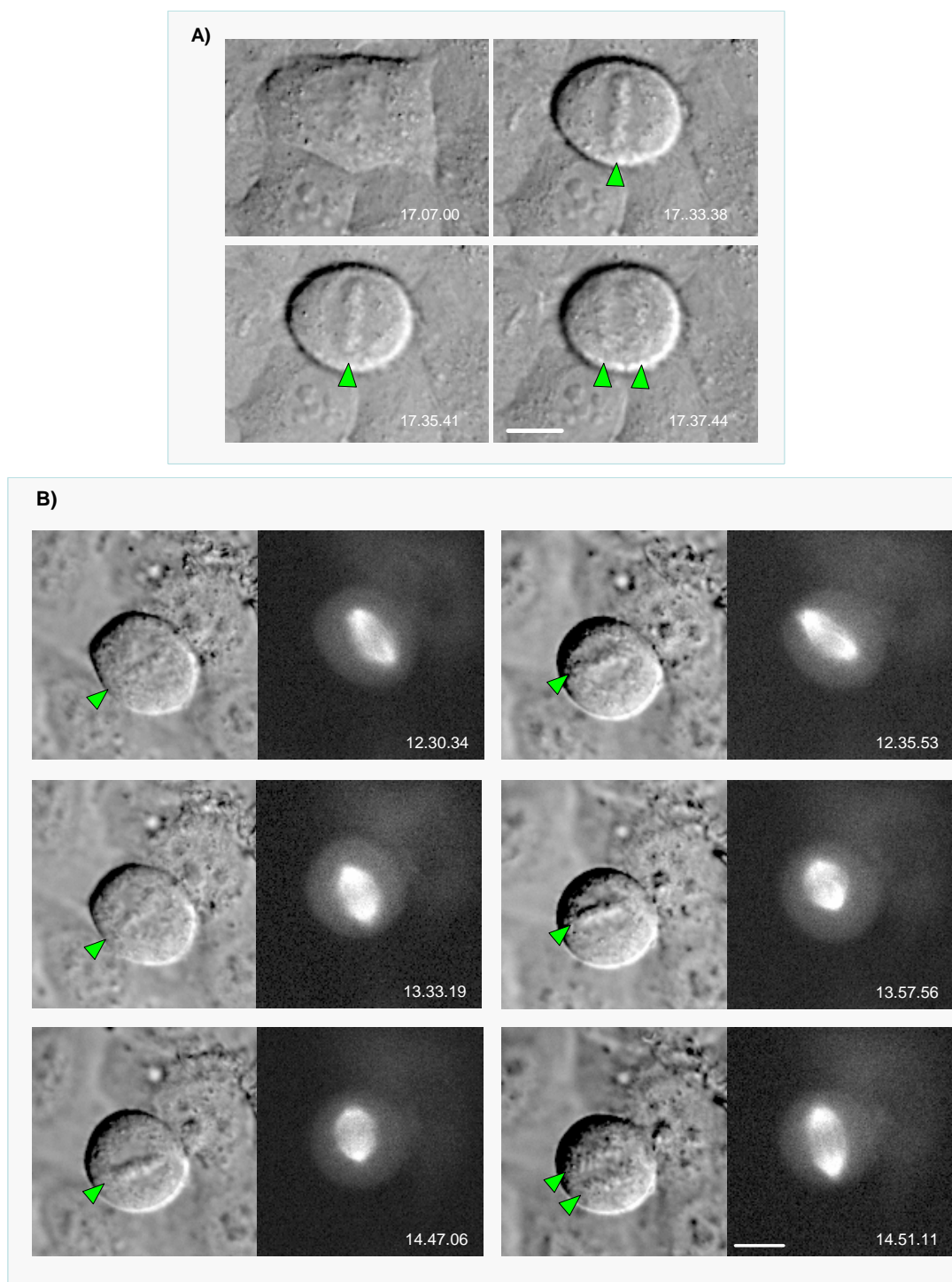


Figura 6.12 – A sobreexpressão de hsMob4A causa um bloqueio em metafase. O tempo (h.min.sec) em que cada fotografia foi tirada é indicado no canto inferior direito. **A)** célula não transfectada que se observa no filme **B)** Célula a sobreexpressar hsMob4A (fotogramas do Filme 6.1). As setas indicam a posição dos cromossomas alinhados. A barra de escala representa 10 μ m.

Não se sabe o destino destas células cujos fusos colapsaram, embora em alguns filmes se observe a entrada em apoptose. Pode-se no entanto admitir que algumas possam eventualmente sair desse estado de mitose e ficar binucleadas.

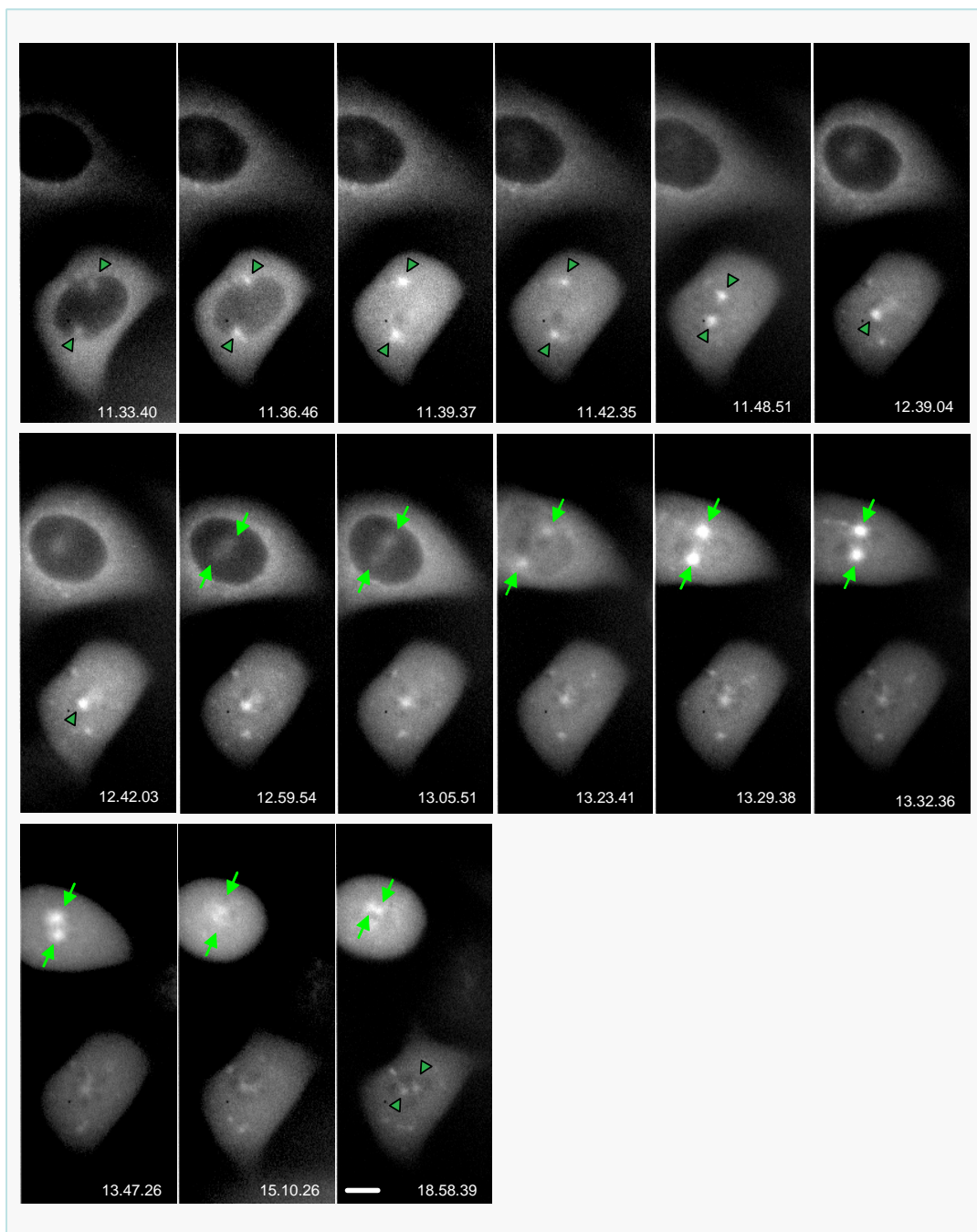


Figura 6.13 – A sobreexpressão de *hsMob4B* provoca o colapso do fuso mitótico. Células a sobreexpressar *hsMob4B* (fotogramas do Filme 6.2). As setas indicam a posição dos centrosomas. O desaparecimento do invólucro nuclear é visível nos fotogramas 11.36.46 e 13.23.41 para a célula inferior e superior, respectivamente. Os centrosomas “caem” um sobre o outro, sem se formar fuso, imediatamente a seguir. O tempo (h.min.sec) em que cada fotografia foi tirada é indicado. Barra de escala - 10 μ m.

Pode-se ainda observar no filme 6.2 a agregação de α -tubulina em vários locais da célula, o que sugere que há vários locais de nucleação de microtúbulos. 60% das células que sobreexpressam hsMob4B, assim como 6,9 % das células que sobreexpressam hsMob4A, apresentam esse fenótipo (ver figura 6.14).

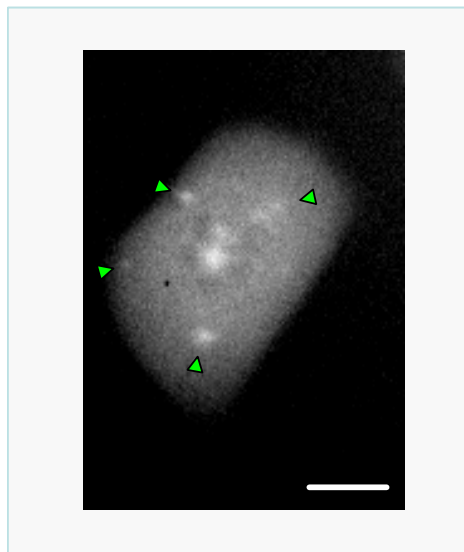


Figura 6-14 – A sobreexpressão de hsMob4B e de hsMob4A causa agregação da α -tubulina. Apresenta-se um fotograma representativo, do Filme 6.2, onde as setas indicam locais de aglomeração de α -tubulina. A barra de escala representa 10 μ m.

Foi ainda possível, analisando as imagens de DIC, observar que 10,34 % das células que sobreexpressam hsMob4A, assim como 4% das células que sobreexpressam hsMob4B, executam uma segregação incorrecta do seu DNA³. Estes números serão muito baixos face aos reais, uma vez que é difícil determinar/observar com rigor os cromossomas em DIC. É possível que esta seja uma das causas do aumento de células binucleadas observado em células fixas.

Finalmente, a análise de microscopia de tempo real permitiu confirmar que a sobreexpressão das duas hsMobs4 causa morte celular. Observou-se que 17,24% e 36% das células que expressam hsMob4A e hsMob4B respectivamente, entraram no que parece ser apoptose durante, ou imediatamente à seguir a mitose (filme 6.3). Este fenótipo não se observou nas células controlo. Estes resultados estão de acordo com o observado anteriormente nas experiências com células fixas.

³ Segregação incorrecta do DNA – Os cromossomas não são distribuídos igualmente pelas duas células filhas.

6.3 Discussão

A análise dos efeitos de sobreexpressão das hsMob4, permitiu concluir que a sobreexpressão de qualquer das duas proteínas em células HeLa provoca morte celular, bem como falhas na divisão celular que resultarão em células binucleadas. Curiosamente, a análise por microscopia em tempo real permitiu observar que a sobreexpressão de hsmob4A tem como fenótipo principal uma paragem em metafase e, por outro lado, que a sobreexpressão de hsMob4B resulta principalmente no colapso dos fusos mitóticos. No entanto, é de salientar que, embora em menor percentagem, o fenótipo de paragem em metafase também se observou para a sobreexpressão de hsMob4B, assim como também se observou o colapsar dos fusos aquando da sobreexpressão de hsMob4A. Ainda assim, estes resultados sugerem que hsMob4A e hsMob4B possam ter funções celulares ligeiramente diferentes/especializadas.

A morte celular observada poderá ocorrer como consequência de uma resposta celular a erros na mitose. Não é estranho que a apoptose e o ciclo celular estejam intimamente ligados, visto que é essencial para a viabilidade de um organismo que células que estejam a proliferar com erros sejam eliminadas (revisto em King & Cidlowski, 1998). De facto, a sobreexpressão da Cdc2 e da ciclina A, duas proteínas essenciais para o início de mitose, aumenta bastante a incidência de apoptose mesmo num *background* de sobreexpressão de Bcl-2⁴ (Meikrantz & Schlegel, 1996). Foi já demonstrado que células humanas, após um tratamento prolongado com nocodazole⁵, conseguem ultrapassar o bloqueio imposto pela activação do ponto-de-controlo saindo de mitose, ao mesmo tempo que activam os mecanismos de apoptose (revisto em Skibbens & Hiet, 1998). A nossa análise de microscopia em tempo real permitiu observar que a sobreexpressão de hsMob4B bloqueia as células num estado mitótico como consequência do colapso dos fusos, e que a sobreexpressão de hsMob4A causa um bloqueio em metafase e que, em ambos os casos, as células terão tendência a entrar em apoptose. Uma possibilidade que se coloca é que esta morte celular observada ocorre como resposta aos erros de divisão. As células ficam bloqueadas em mitose demasiado tempo e o organismo acaba por activar os mecanismos de apoptose. Os mecanismos de apoptose estão obviamente funcionais nestas células. Outra evidência é dada pelo facto de não se detectar um aumento de células tetranucleadas. Este facto sugere que as células binucleadas geradas pela sobreexpressão de Mob4 não são capazes de realizar um novo ciclo de divisão.

⁴ A sobreexpressão de Bcl2 torna as células resistentes à apoptose.

⁵ Agente despolimerizador de microtúbulos. As células param em prometáfase como resposta à activação do *checkpoint* que verifica a integridade do fuso mitótico.

Foi possível observar que a sobreexpressão de hsMob4A provoca uma longa paragem em metafase (em média 87,8 minutos). Esta paragem em metafase poderá ser explicada por uma activação do ponto-de-controlo mitótico, causada pelo aumento da estabilidade dos microtúbulos (que terão a dinâmica alterada). Os resultados da sobreexpressão mostram que a hsMob4A pode influenciar a estabilidade dos microtúbulos. Os microtúbulos do fuso têm um *turn-over* muito rápido, de 60-90 segundos (revisto em Wittmann *et al.*, 2001). O *turn-over* dos microtúbulos do fuso é controlado por proteínas que alteram a sua frequência de catástrofe, isto é, que controlam a mudança de um estado de polimerização para um estado de despolimerização (revisto em Wittmann *et al.*, 2001). Estão descritas várias proteínas que a promovem a catástrofe de microtúbulos (Op18/stathmin, XKCM1), assim como proteínas que os estabilizam. Estas contrariam a acção das que promovem catástrofes. Assim, o fuso mitótico é o resultado de uma estabilidade dinâmica entre diversos factores. Como se pode observar nos ensaios preliminares de re-nucleação, a sobreexpressão de hsMob4A parece aumentar a estabilidade dos microtúbulos. É assim bastante plausível que a paragem em metafase que se observa aquando da sobreexpressão de hsMob4A seja devida a alterações na dinâmica dos microtúbulos do fuso, tornando-os mais estáveis.

Alternativamente, a paragem poderá ser provocada por uma dificuldade dos cromossomas alinharem na placa metafásica. Nos filmes realizados, a observação por DIC dos cromossomas é difícil e não se pode afirmar com certeza quando é que todos os cromossomas são alinhados. E basta que um cromossoma não esteja alinhado para que o ponto-de-controlo esteja activo.

Uma outra hipótese é a de hsMob4A interferir directamente com o mecanismo de ponto-de-controlo, impedindo a sua inactivação atempada. Neste trabalho verificou-se que uma porção significativa da proteína Mob se acumula nos cromossomas mitóticos e, experiências realizadas no nosso laboratório e no laboratório do Dr. David Glover com a proteína Mob4 de *Drosophila*, indicam claramente que esta se acumula nos cinetocoros durante a metafase (Wainman, Glover & Tavares, resultados não publicados). O significado desta localização de Mob4 é ainda desconhecido, mas é nos cinetocoros que se encontram os componentes do ponto-de-controlo. Para a correcta segregação dos cromossomas, é necessário que cada cinetocoro se ligue a microtúbulos oriundos de cada polo do fuso (orientação bipolar). O ponto-de-controlo de montagem do fuso (spindle assembly checkpoint) garante que não se inicia anafase até que todos os cromossomas tenham estabelecido uma orientação bipolar. Já se identificaram várias proteínas que pertencem ao mecanismo de ponto-de-controlo de montagem do fuso, sendo uma destas a proteína Mps1 (revisto em Lew & Burke, 2003). A proteína Mps1 foi inicialmente identificada em *S.cerevisiae*, tendo-lhe sido atribuída duas funções: uma na duplicação do corpo polar do

fuso (equivalente aos centrossomas em levedura) e outra no ponto-de-controlo de montagem do fuso (Weiss & Winey, 1996). Esta função no ponto-de-controlo de montagem do fuso foi confirmada em *S. pombe*, em *Xenopus* e em células humanas (He *et al.*, 1998; Abrieu *et al.*, 2001; Stucke *et al.*, 2002). Uma das consequências da sobreexpressão de proteínas componentes do ponto-de-controlo de montagem do fuso, é que as células páram em metafase. De facto, a sobreexpressão de Mps1 induz a paragem em metafase em *S.cerevisiae* (revisto em Lew & Burke, 2003) e em *Drosophila* (Faria, M. & Tavares, A., resultados não publicados). De lembrar que a proteína scMob1 foi inicialmente identificada por interagir com a Mps1 (Luca & Winey, 1998). Se a proteína hsMob4A interagir com a Mps1 humana, uma possibilidade para explicar a paragem em metafase observada após a sobreexpressão de hsMob4A, é que esta causa uma sobreactivação do *ponto-de-controlo* de montagem do fuso.

A formação e manutenção da estabilidade do fuso é regulada em embriões de *Drosophila* por três proteínas motoras: KLP61F, Dineína e Ncd (Sharp *et al.*, 2000). A KLP61F e a Dineína actuam na separação dos polos do fuso, e a Ncd antagoniza estes dois motores, funcionando como um travão da separação dos polos do fuso (Sharp *et al.*, 2000). A inibição de KLP61F permite a separação dos centrossomas, mas causa um colapso muito rápido dos fusos imediatamente após a quebra do envelope nuclear (Sharp *et al.*, 1999). A cinase Aurora A é também essencial para a formação de fusos bipolares. A inibição desta cinase por RNAi, em *C.elegans*, resulta também num colapso dos fusos pouco depois da quebra do envelope nuclear (Hannak *et al.*, 2001). Como se viu, a sobreexpressão de hsMob4B causa também um colapso dos fusos mitóticos imediatamente após a quebra do envelope nuclear. É possível então que a sobreexpressão de hsMob4B cause um desequilíbrio entre as forças que separam os centrossomas e permitem a formação do fuso, e as forças que puxam os centrossomas um para o outro.

Assim, e embora com efeitos diferentes, tanto a hsMob4A como a hsMob4B pareceram afectar, quando sobreexpressas, a dinâmica/estabilidade dos microtúbulos e do fuso mitótico. Se esta acção é directa ou por intermédio de outras proteínas é algo que terá ainda de ser estudado.

Os ensaios de renucleação permitiram observar que a expressão ectópica hsMob4A ou de hsMob4B induz a formação de centros de nucleação de microtúbulos, e a de RFP.hsMob4A causa provoca a agregação imprópria de grandes quantidades de γ -tubulina. Não sabemos se os agregados que nucleiam microtúbulos contêm outros componentes centrossomais. Este aspecto terá que ser estudado futuramente.

6.5 Legendas dos filmes

Filme 6.1 (referente à Figura 6.12) – *Paragem em metafase numa célula a sobreexpressar hsMob4A.*

Filme 6.1.1 – *Paragem em metafase numa célula a sobreexpressar hsMob4A.* A célula da esquerda (arredondada e com marcação de tubulina no canal GFP – ver filme 6.1.2) manteve-se em metafase durante 141 minutos (a placa metafásica é visível). Uma das células à direita, não transfectada, vai entrar e sair de mitose num intervalo de tempo normal.

Filme 6.1.2 - *Paragem em metafase numa célula a sobreexpressar hsMob4A.* É o mesmo filme que 6.1.1 mas em fluorescência. Notar a célula da esquerda que está transfectada com GFP-tubulina.

Filme 6.2 (referente à Figura 6.13) – *Colapso dos fusos após a sobreexpressão de hsMob4B..*

Apresenta-se apenas o canal de fluorescência. Em ambas as células são visíveis os dois centróssomas. Imediatamente após a quebra da membrana nuclear (visível pelo desaparecimento da mancha escura que marca o núcleo) os centróssomas colapsam um sobre o outro e o fuso não se forma. É possível detectar os cromossomas numa disposição circular (mancha escura) em redor dos dois centróssomas. É ainda possível detectar a presença de agregados de tubulina no citoplasma após o colapso dos fusos.

Filme 6-3 – *Morte celular após falha de citocinese.*

Filme 6.3.1 – *Morte celular após falha de citocinese.* A célula a sobreexpressar hsMob4A, morre após ter falhado a citocinese. O mesmo comportamento foi observado em células a sobreexpressarem hsMob4B.

Filme 6.3.2 - *Morte celular após falha de citocinese.* Apresenta-se o mesmo filme que 6.3.1 mas no canal de fluorescência. Ver filme 6.3.1.

7. RNAi simples de hsMob4A e hsMob4B

7.1 Análise de células fixas

A depleção de hsMob4A e de hsMob4B por RNAi foi executada como descrito no capítulo 5, para o RNAi duplo. No entanto, neste caso, as células foram tratadas com os oligos contra apenas uma das hsMobs4; procedeu-se à fixação dois dias após a transfecção, e o fenótipo foi analisado por microscopia de fluorescência. Como controlo negativo da experiência, utilizou-se o *scramble duplex*, tendo sido igualmente analisadas células não transfectadas.

A análise do fenótipo da depleção simples de hsMob4A ou de hsMob4B indicou que os defeitos (mesmo os mais raros) que se observam no RNAi duplo (A&B) também se observaram nos RNAi simples. Verificou-se que a depleção simples, tanto de hsMob4A como de hsMob4B, também resulta na formação de cadeias de células e de citoplastos adjacentes a células binucleadas. No entanto, a comparação da intensidade dos efeitos é bastante diferente entre cada uma das hsMobs4. Assim, o aumento de células binucleadas é ligeiro quando se depleta hsMob4B, e elevado em células sem hsMob4A (figura 7.1). De facto, se compararmos os resultados obtidos com os observados na depleção de hsMob4(A&B), torna-se sugestivo que as células binucleadas observadas no RNAi duplo são essencialmente provocadas pela ausência de hsMob4A. No entanto, algum papel haverá para a hsMob4B, pois o aumento de células binucleadas que se observa após a depleção de hsMob4B apesar de ligeiro, é constante e reprodutível (ainda assim observavam-se duas vezes mais células binucleadas após a depleção de hsMob4B, relativamente aos controlos). O número de células binucleadas aqui apresentado após a depleção de hsMob4(A&B) é ligeiramente superior ao apresentado no capítulo 5. No entanto, resulta de uma nova série de experiências e, nestas experiências, o controlo também tinha um número ligeiramente superior de células binucleadas.

A análise da separação dos centríolos revelou uma situação inversa: a depleção de hsMob4B resulta numa maior percentagem de células com os dois centríolos separados do que a depleção de hsMob4A (figura 7.2). Enquanto que a depleção de hsMob4A quase não parece induzir uma maior separação dos centríolos, após a depleção de hsMob4B observou-se um aumento de 6,8% para 14% de células com os dois centríolos separados mais do que 3 μ m. Estes resultados por seu lado, parecem indicar que a hsMob4A não tem qualquer acção na coesão dos centríolos. No entanto, após a depleção dupla observam-se 25,7% de células com os centríolos separados mais de 3 μ m, quase o dobro dos observados após a depleção simples de hsMob4B. A depleção simultânea dos dois Mobs 4 tem pois um efeito sinérgico, o que indica que ambas as Mobs 4 humanas são importantes na manutenção da coesão dos centríolos.

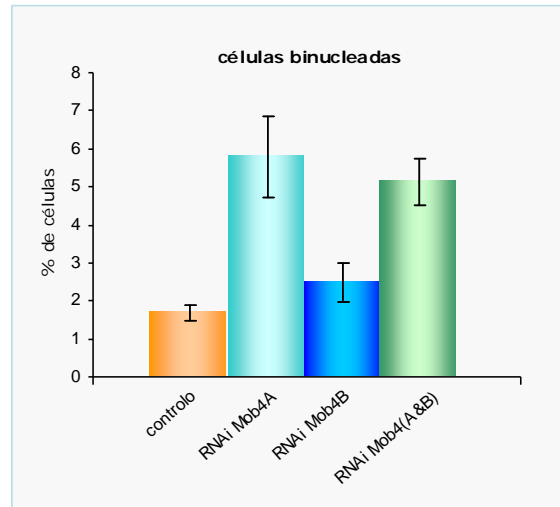


Figura 7.1 – Fenótipo causado por RNAi de *hsMob4A* ou *hsMob4B* – células binucleadas. O controle refere-se a *scramble duplex*. Apresenta-se a média de 3 experiências independentes; em cada uma foram analisadas entre 550 a 650 células.

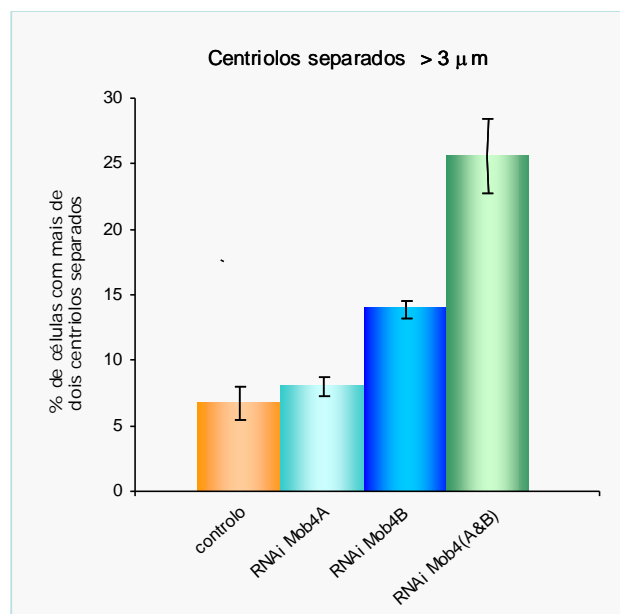


Figura 7.2 – Fenótipo causado por RNAi de *hsMob4A* ou *hsMob4B* – separação de centríolos. O controle refere-se a *scramble duplex*. Apresenta-se a média de 3 experiências independentes; em cada uma foram analisadas entre 550 a 650 células.

Em conclusão, os ensaios de RNAi simples de *hsMob4A* e de *hsMob4B* mostram que a depleção de qualquer uma das *hsMob4* causa um fenótipo mitótico, indicando que são ambas necessárias para mitose. Para além disso, os efeitos observados são ligeiramente diferentes num caso e no outro, sugerindo que, embora haja alguma complementaridade, as *hsMob4* devem também possuir funções específicas. Após a depleção de *hsMob4A* observa-se principalmente um aumento na percentagem de células

binucleadas, enquanto que após a depleção de hsMob4B se observa sobretudo um aumento na percentagem de células com os dois centríolos separados.

7.2 Análise em microscopia de tempo real

Pensou-se que se poderia ter uma melhor compreensão dos efeitos causados pela depleção de hsMob4A e de hsMob4B através de estudos em microscopia de tempo real. Os ensaios foram realizados como descrito no capítulo 5: as células foram sincronizadas com um duplo bloqueio em timidina, transfectadas no intervalo entre os dois bloqueios com oligos contra hsMob4A ou contra hsMob4B, começando-se a filmar 8 a 10 horas após a libertação do segundo bloqueio. De três experiências independentes, foram analisadas 60 células nos ensaios controlo, 71 células no RNAi de hsMob4A e 51 células no RNAi de hsMob4B.

Sem grande surpresa, verificou-se que, relativamente à duração de cada uma das fases da mitose, o efeito mais significativo foi sobre o tempo que as células demoram de telofase até completarem a citocinese (tabela 7.1 – células ligadas). As células controlo demoram em média 3,13 horas desde o final de telofase¹ até citocinese, ao passo que depleção de hsMob4A resulta em que as células demoram em média 5,81 horas até completarem citocinese. No caso da depleção de hsMob4B, as células levam em média 4,73 horas a completar citocinese. Estes resultados são por si só sugestivos de uma função necessária para a citocinese de ambas as hsMob4.

	Tempo em cada fase do ciclo					
	Scramble duplex (minutos) (horas)		hsMob4A (minutos) (horas)		hsMob4B (minutos) (horas)	
Prometáfase	73,7	1,2	85,2	1,4	52,5	0,9
Metafase	5,0	0,1	6,2	0,1	2,9	0,04
Anafase	13,2	0,2	15,7	0,3	10,9	0,2
Telofase	64,1	1,1	82,8	1,4	56,2	0,9
Células ligadas	188,1	3,1	348,8	5,8	283,6	4,7

Tabela 7.1 – Fenótipo causado por RNAi de hsMob4A ou hsMob4B (microscopia em tempo real) – tempo em cada fase do ciclo celular. Analisaram-se 60 células para o controlo, 71 células para o RNAi de hsMob4A e 51 células para o RNAi de hsMob4B.

¹ Sendo o final da telofase definido como o momento em que as células reformam a membrana nuclear, e o núcleo aparece descondensado.

Para uma melhor compreensão do tempo necessário para completar citocinese em cada um dos casos, as células foram agrupadas de acordo com o tempo que demoram desde o fim da telofase até citocinese (figura 7.3). Verifica-se que a depleção de hsMob4A faz com que 63% das células demorem mais de 4 horas até completarem citocinese e que, significativamente, 34,4% destas demoram mais de 6 horas. Por outro lado, após a depleção de hsMob4B, 62,5 % das células demoram menos de 4 horas até completarem citocinese, embora 20% das células demorem mais de 6h, sendo que nos controlos só 2% das células se observam nesta situação.

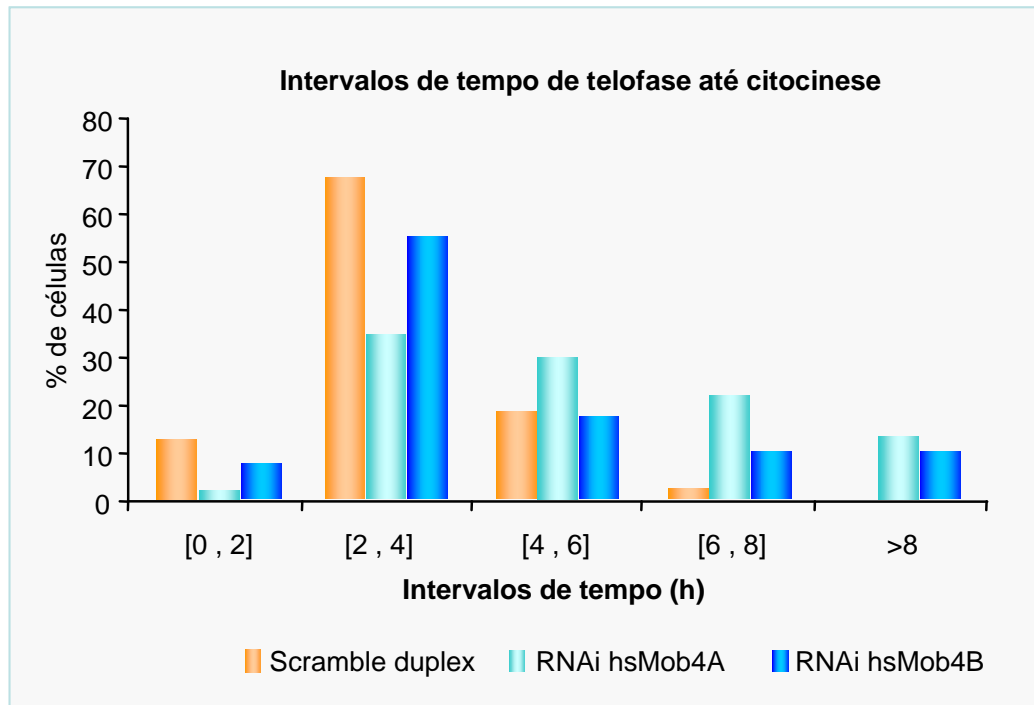


Figura 7.3 – Análise em microscopia “in vivo” da depleção simples de hsMob4A e hsMob4B: intervalos desde o início de telofase até à citocinese. Analisaram-se 60 células para o controlo, 71 células para o RNAi de hsMob4A e 51 células para o RNAi de hsMob4B.

É notório que 10% das células sem hsMob4B, assim como 13% das células sem hsMob4A, demorem mais de 8 horas até completarem a citocinese. De lembrar que a depleção simultânea de hsMob4(A&B) teve como resultado um atraso de mais de 8h até finalização da citocinese em 20 % das células (capítulo 5). Estes valores sugerem também que a depleção simultânea de hsMob4A e de hsMob4B actua sinergicamente, no atraso da execução da citocinese.

Tanto a depleção de hsMob4A como de hsMob4B causou grandes atrasos até à finalização da citocinese, sendo que o maior intervalo de tempo observado desde a telofase até à citocinese foi de 21,8 horas para a hsMob4A, e de 19,2 horas para a hsMob4B; no controlo este intervalo tem apenas 6,5 horas. Além disso, tal como para a depleção dupla

hsMob4(A&B) (capítulo 5), após a depleção simples de hsMob4A e de hsMob4B, foram observadas células ligadas por pontes intracelulares muito longas.

Analisou-se ainda em detalhe, célula a célula, o fenótipo que a depleção simples de hsMob4A e de hsMob4B provoca (tabela 7.2). Tal como na depleção dupla, 45,1% e 49% das células do RNAi de hsMob4A e de hsMob4B respectivamente, não apresentam uma placa metafásica definida.

	Scramble duplex	hsMob4A	hsMob4B
Paragem em metafase	3,1	7,0	7,8
Sem placa metafásica	23,2	45,1	49
Binucleadas	3,2	16,2	7,7
DNA mal segregado	5,1	12,3	8,5
Citoplastos	0	2,8	0
Reversão do sulco de clivagem	0	10,2	3,6
Sulcos de clivagem extra	9,2	10,2	23,2
Cadeia de células	0	3,7	1,8
Célula a mover-se	22,6	32,9	69,9
Citocinese provocada por movimento	1,5	2,6	7,1

Tabela 7.2 *Análise em microscopia “in vivo” da depleção simples de hsMob4A e hsMob4B: defeitos observados.* Analisaram-se 60 células para o controlo, 71 células para o RNAi de hsMob4A e 51 células para o RNAi de hsMob4B..

A análise por microscopia de tempo real confirmou ainda os resultados obtidos relativamente às células binucleadas. A depleção de hsMob4A parece causar um aumento de células binucleadas superior ao observado na depleção de hsMob4B. No caso do RNAi de hsMob4A, 16.2 % das células analisadas tornam-se binucleadas, o que corresponde a um aumento de 4.9 vezes; por outro lado, no RNAi de hsMob4B, observaram-se 7.7% de células binucleadas, o que corresponde a um aumento de 2,4 vezes relativamente ao controlo. As células binucleadas parecem formar-se por dois processos distintos: no caso da hsMob4B, 25% destas formaram-se por reversão do sulco de clivagem e 75% destas por erros na segregação do DNA². No caso da hsMob4A, 40% das células binucleadas têm origem devido a erros na segregação do DNA, e 60% resultam de erros de citocinese. Destes, 50% formaram-se por reversão do sulco de clivagem e 10% por erros de clivagem (em que se formou um citoplasto e uma célula binucleada). Estes resultados implicam

² Definiu-se como erros de segregação de DNA quando se detectava por DIC os cromossomas não eram igualmente distribuídos entre as duas células filhas.

hsMob4A e hsMob4B na correcta segregação do DNA cromossómico, assim como na sinalização da citocinese.

Interessantemente, 10,2% das células sem hsMob4A e 23,2 % das células sem hsMob4B apresentaram sulcos de clivagem extra. Como no controlo se observou que 9,2 % das células tinham sulcos de clivagem extra, e que na depleção dupla 25,6 % das células tinham este fenótipo, os sulcos de clivagem extra serão então devidos à depleção de hsMob4B.

Ocorreu também a formação das cadeias de células tanto na depleção de hsMob4A como na depleção de hsMob4B. Uma vez mais, observa-se que as células estão tanto tempo ligadas, que iniciam uma nova divisão sem executar a citocinese anterior. Relativamente às cadeias de células, 1,8% e 3,7 % das células formam cadeias após a depleção de hsMob4B e de hsMob4A respectivamente. Como na depleção dupla de hsMob4(A&B) se observa a formação de cadeias de células em 6,4% das células totais analisadas, parece uma vez mais que hsMob4A e hsMob4B actuam sinergicamente na execução da citocinese.

Em alguns casos, observou-se movimento celular (ver em baixo), e este precipitou a clivagem em 2,6% das células sem hsMob4A e em 7,1 % das células sem hsMob4B. Estes valores são no entanto muito menores aos observados para a depleção dupla, onde o movimento celular precipitou a clivagem em 24,3% das células. A hsMob4a e a hsMob4B poderão assim também actuar sinergicamente na promoção do movimento das células.

7.3 Depleção de hsMob4A e hsMob4B: análise do movimento celular

Ao analisar o efeito causado pela depleção simples de hsMob4A e de hsMob4B, observou-se que estas células também ganham mobilidade: 33% das células sem hsMob4A e 70% das células sem hsMob4B movem-se, enquanto apenas 22% das células o fazem. Como descrito no capítulo 5, filmaram-se as células deplectadas em cada hsMob4 com uma objectiva de menor ampliação (20X).

De referir que a análise dos efeitos da depleção de hsMob4 com a objectiva de menor ampliação permitiu seguir uma mesma célula durante mais tempo sem que esta saísse de campo, e conseguiu-se assim observar que 30% das células sem hsMob4B executam duas mitoses durante o decorrer do filme (aproximadamente 22-23 horas), enquanto que apenas em 3,51% das células controlo se observou esse efeito. Surpreendentemente, uma célula demorou apenas 11 horas entre o início de duas mitoses consecutivas.

Tanto as células deplectadas em hsMob4A como as células deplectadas em hsMob4B parecem ter maior mobilidade do que os controlos. Observa-se no RNAi controlo alguma mobilidade celular, até com algumas variações no sentido do movimento. No entanto, a maioria das células transfectadas com o *scramble duplex*, apenas deslizam ligeiramente do seu ponto inicial de partida (discutido no capítulo 5) como que a afastarem-se após a divisão. No caso das deplecções simples de hsMob4A e de hsMob4B, observa-se uma muito maior mobilidade celular, na qual as células fazem percursos mais sinuosos, afastando-se do centro onde ocorreu a divisão e variando bastante a direcção do movimento.

As células deplectadas em hsMob4A têm, no entanto, um movimento menos errático do que as células deplectadas em hsMob4B. Ao observar a figura 7.4, verifica-se que em 25,8% das células sem hsMob4A não se observa qualquer variação de sentido de movimento, enquanto que nas células sem hsMob4B apenas 12% apresentam esta característica. Este resultado sugere que, apesar de ambas as deplecções simples de hsMob4A ou de hsMob4B causarem mobilidade celular, a deplecção de hsMob4B provoca uma maior mobilidade celular do que a deplecção de hsMob4A. Relativamente às células que consideramos terem movimento efectivo³, as células sem qualquer dos Mob4 apresentam muito mais variações no seu sentido de movimento do que as células controlo, especialmente quando se considera o intervalo de variações de sentido de movimento entre 6 a 10 vezes. Foi ainda possível observar que 6% das células sem hsMob4A, assim como 6,9% das células sem hsMob4B, variam mais de 10 vezes o sentido do seu movimento. Não se observou nenhuma célula controlo que tal fizesse. É ainda importante lembrar que 27,8% das células sem hsMob4(A&B) alteram mais de 10 vezes o sentido do seu movimento.

As células sem hsMob4A ou sem hsMob4B percorrem em média uma distância de 190,1 μm e de 223,50 μm respectivamente. Estas células deslocam-se no entanto, em ambos os casos, no interior de um círculo com aproximadamente 87 μm de diâmetro. Este resultado indica, uma vez mais, uma maior mobilidade e variação de sentido de movimento para a deplecção hsMob4B do que para a deplecção de hsMob4A. Para o controlo observamos que as células têm um percurso médio de 62,9 μm (num círculo de diâmetro médio de 43,8 μm). Para a deplecção de hsMob4(A&B) o percurso médio é de 267,52 μm e o diâmetro de 94,67 μm .

Uma outra questão que surgiu, foi saber as velocidades médias e instantâneas das células sem hsMob4A e sem hsMob4B. Foi possível detectar que 79% das células sem

³ Consideramos que uma célula se move quando muda mais do que uma vez o sentido do seu movimento.

hsMob4A, e 85% das células sem hsMob4B apresentam velocidades instantâneas⁴ superiores a 10 $\mu\text{m/h}$, enquanto que 63% das células controlo têm velocidades instantâneas menores que 10 $\mu\text{m/h}$ (figura 7.5). Relativamente às velocidades máximas, podemos observar que a velocidade máxima obtida para a depleção de hsMob4A (90 $\mu\text{m/h}$) é relativamente próxima da velocidade máxima observada nas experiências controlo (70 $\mu\text{m/h}$). No entanto, a velocidade máxima observada após a depleção de hsMob4B foi quase o dobro da velocidade máxima observada nos controlos (aumentou de 70 $\mu\text{m/h}$ para 130 $\mu\text{m/h}$). Na depleção dupla de hsMob4(A&B) observa-se como velocidade instantânea máxima o valor impressionante de 273 $\mu\text{m/h}$.

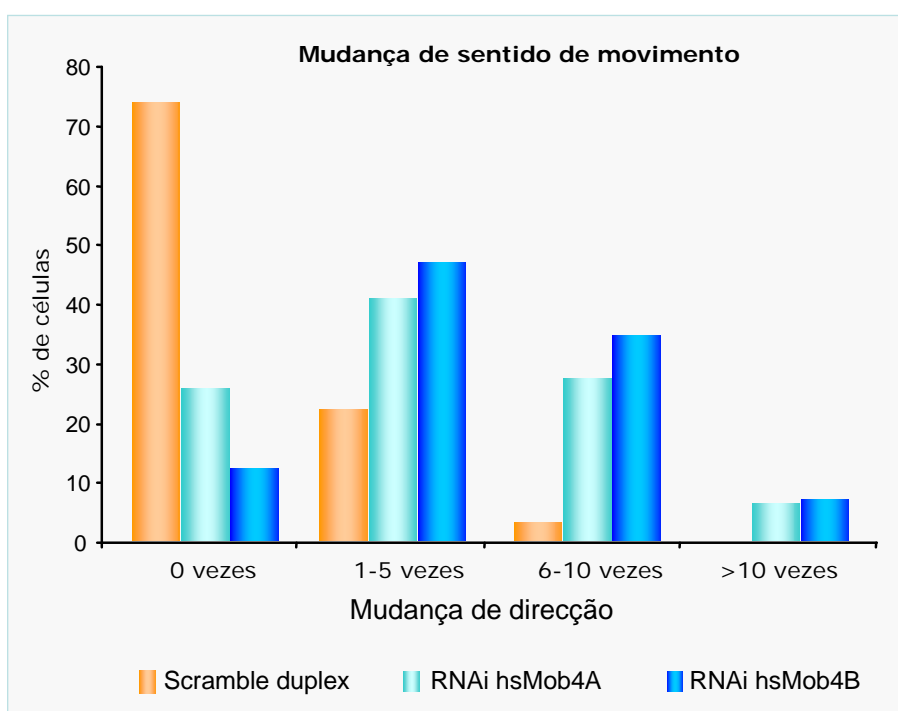


Figura 7.4 - A depleção de *hsMob4A* e de *hsMob4B* provoca variação no sentido do movimento das células. Seguiu-se o percurso do centro do núcleo da cada célula em dois campos completos (dois filmes) em cada uma de duas experiências independentes. Analisaram-se 66 células para o RNAi de *hsMob4A*, 58 células para o RNAi de *hsMob4B* e 57 células para o RNAi controlo. Apresenta-se o número de vezes que as células mudaram o sentido do movimento.

Os resultados apresentados sugerem fortemente que *hsMob4A* e *hsMob4B* não são completamente redundantes, e que têm funções ligeiramente especializadas. Assim, a análise dos efeitos da depleção simples demonstrou principalmente um aumento de células binucleadas para a depleção de *hsMob4A*. Por outro lado, observou-se uma perda de coesão dos centríolos para a depleção de *Mob4B*.

⁴ Velocidade instantânea – velocidade percorrida por uma célula quando esta se movia numa só direcção.

Velocidade média – média de todas as velocidades instantâneas de uma determinada célula.

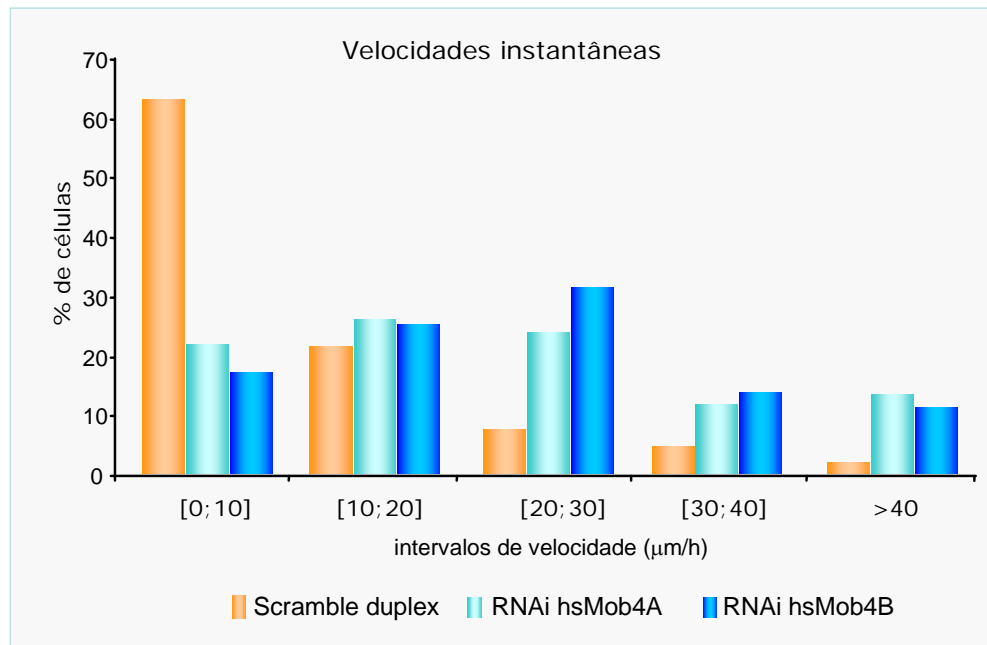


Figura 7.5 - A depleção de *hsMob4A* e de *hsMob4B* aumenta instantânea das células. Seguiu-se o percurso do centro do núcleo da cada célula em dois planos (dois filmes) de cada de duas experiências independentes. Analisaram-se 66 células para o RNAi de *hsMob4A*, 58 células para o RNAi de *hsMob4B* e 57 células para o RNAi controlo.

7.4 Discussão

Observou-se que células deplectadas de *hsMob4B* variam bastante no tempo necessário para executar a citocinese. Por outro lado, células sem *hsMob4A* apresentam valores homogêneos e consistentemente mais longos do que células sem *hsMob4B*. Uma possibilidade para explicar estes resultados será que *hsMob4A* esteja envolvida na sinalização do evento de clivagem, enquanto que *hsMob4B* actua na orientação dos centríolos. Se for este o caso, após a depleção de *hsMob4A*, o centríolo mãe poderá eventualmente mover-se até ao midbody, mas falhar a sinalização, estando directamente relacionado com um aumento nos tempos de clivagem e também com o maior aumento de células binucleadas. Se *hsMob4B* estiver envolvido na orientação dos centríolos, mais particularmente, na orientação do centríolo mãe até ao midbody, a sua depleção também induzirá atrasos na citocinese, mas os efeitos observados serão diferentes, e será

expectável uma grande variação nos tempos de execução da citocinese. Esta hipótese pressupõe que os centríolos estejam à “*deriva*” no citoplasma das células, demorando um tempo indeterminado até que se aproximem do midbody e sinalizem a citocinese. Sabe-se pelo trabalho de Piel *et al.* (2000) que antes da movimentação do centríolo mãe para o midbody, o centríolo filho se movimenta aleatoriamente pelo citoplasma da célula enquanto que o centríolo mãe mantém uma posição central. E se a depleção de hsMob4B causar um movimento errático dos dois centríolos nesta fase do ciclo celular? Esse movimento poderia ter como consequência a desorientação do centríolo mãe. Uma desorientação dos centríolos causaria grandes variações na sinalização da clivagem, pois o tempo que uma célula demoraria até executar citocinese seria dado pela probabilidade do centríolo passar pelo midbody, e sinalizar a clivagem. Uma observação que poderá ser eventualmente favorecer esta hipótese é o facto ser após a depleção de hsMob4B que se observa uma maior separação de centríolos.

Tanto a depleção de hsMob4A como a depleção de hsMob4B provocam um aumento na mobilidade celular, com um efeito mais forte no caso de hsMob4B. Se o movimento celular se encontrar directamente correlacionado com a polaridade celular, e essa polaridade for dependente da organização do citoesqueleto, a hipótese da desorientação dos centríolos no caso da depleção de hsMob4B explicará os fenótipos de movimento celular, uma vez que as células sem hsMob4B estariam com os centríolos desorientados e a movimentarem-se erraticamente no citoplasma, enquanto as células sem hsMob4A estariam com os centríolos com um comportamento menos aleatório. O facto do aumento da separação de centríolos após a depleção de hsMob4A ser praticamente nula, poderá sugerir que a movimentação dos centríolos após a depleção de hsMob4A é normal.

8. Discussão

Este trabalho teve como objectivo o estudo dos genes Mob em células humanas, em particular dos genes hsMob4A e hsMob4B. Verificou-se que o genoma humano contém sete genes pertencentes a esta família, subdivididos em quatro subgrupos. Os genes hsMob4A e hsMob4B codificam duas proteínas com 96% de identidade, sendo apenas diferentes em nove aminoácidos, que não parecem formar um domínio funcional ou estrutural.

8.1 As hsMob4 como promotoras dos eventos finais da citocinese

Os ensaios de imunolocalização mostraram que a hsMob4 se acumulava nos centrossomas durante todo o ciclo celular, e que muito interessadamente, no final da mitose se acumula apenas no centríolo mãe. Quando se obtiveram estes resultados, não encontrava descrita ainda qualquer proteína com uma localização semelhante, mas, muito recentemente - Maio de 2003 – foi descrita uma nova proteína humana, a centriolina, com uma localização semelhante à Mob4, acumulando-se também no centríolo mãe em telofase tardia (Gromley *et al.*, 2003). Estas observações muito relevantes tendo em conta os resultados obtidos por Piel *et al.* (2001), que descreveram que em células de mamíferos, o centríolo mãe tem um papel essencial no controlo da clivagem. Estes autores observaram que de modo a que se dê a separação física entre as duas células filhas, é necessário a movimentação do centríolo mãe até ao midbody e o seu reposicionamento no centro da célula. Em conjunto com os dados obtidos em leveduras, onde os genes são necessários para a promoção da saída de mitose e da citocinese, a localização da proteína hsMob4 aqui descrita sugere fortemente que, em vertebrados, o produto dos genes hsMob4A e hsMob4B estará também envolvido nos eventos finais que culminam na separação física das duas células filhas.

A análise dos efeitos da depleção simultânea de hsMob4(A&B) revelou que as células (HeLa) sem hsMob4 tinham uma incapacidade de completarem a clivagem, ficando as células ligadas por longas pontes intercelulares. Um fenótipo semelhante (pontes intracelulares longas) foi descrito recentemente nos casos de sobreexpressão de fosfatase hsCdc14A e de depleção de centriolina (Kaiser *et al.* 2002; Gromley *et al.*, 2003), proteínas também homólogas de componentes das MEN e SIN de *S. cerevisiae* e *S. pombe*, respectivamente.

Foi ainda muito interessante observar que estas células depletadas de hsMob4(A&B), quando ainda ligadas, são capazes de entrar numa nova mitose, originando cadeias de células interligadas. Estes resultados implicam que:

- As hsMob4 humanas não são (como o seu homólogo de *S. cerevisiae*) necessárias para a saída de mitose. Como a depleção de hsMob4(A&B) não afecta a duração das diferentes fases da mitose e o que se observa é a progressão normal pelo ciclo celular - bem como a re-entrada num novo ciclo com execução de nova mitose, sem a ocorrência da citocinese prévia – as células obrigatoriamente saíram de mitose.
- As hsMob4 humanas são necessárias para a citocinese. O que se observou após a depleção de hsMob4(A&B) foi que as células pareciam executar todos os eventos até citocinese de uma forma normal: observa-se inclusive a formação do sulco de clivagem e a constrição da região central. No entanto, após da formação da ponte intercelular, as células não completam a citocinese, podendo em alguns casos, ocorrer mesmo a reversão do sulco de clivagem.

As experiências de depleção de hsMob4(A&B) implicaram igualmente estas proteínas na coesão dos centríolos das células em interfase. Após a depleção das Mob4, para além de se observar um aumento no número de células com os centríolos separados, a distância que existe entre ambos é frequentemente muito superior às distâncias de separação existentes entre os centríolos das células controlo. Os resultados sugerem então que se perdeu um elemento de coesão dos centríolos.

Os resultados apresentados (obtidos em células fixas) não permitem identificar com clareza o momento da interfase (G1, S ou G2) em que se observa a separação dos centríolos. No entanto, pensamos que os centríolos se encontram separados em G1, antes da duplicação dos centrossomas, uma vez que não detectámos células com quatro centríolos separados (o que se verificaria caso os centrossomas duplicassem). Pensamos além disso que, a separação dos centríolos ocorre como normalmente em telofase pois não detectámos figuras metafásicas com os centríolos separados, mas observámos múltiplas telofases em que eles estavam separados. Propomos assim que os centríolos se separam na altura correcta, fim de telofase, e que sejam incapazes de se voltarem a juntar. A ser verdade que a separação de centríolos induzida pela ausência de hsMob4(A&B) se dá em telofase e se perpetua em G1, poder-se-á então pôr a hipótese que estas proteínas não são importantes para *manter* a coesão dos centríolos após a sua duplicação, mas sim que são necessárias para os juntar após a citocinese. Este problema poderá ser devido à “desorientação” dos centríolos, que também deve ser a base da falha da citocinese.

Pensamos assim que os defeitos de citocinese observados nas células sem Mob4 serão possivelmente devidos a um mau funcionamento dos centrossomas/centríolos nesta fase do ciclo celular. De facto, e como descrito na introdução, os centrossomas estão

implicados na fidelidade do processo citocinético em células eucariotas, pois, se forem eliminados por processos mecânicos ou por destruição com laser, observa-se uma paragem em citocinese ou mesmo a falha deste processo celular (Hinchcliffe *et al.*, 2001 ;Khodjakov & Rieder, 2001). Para além disso, o facto de hsMob4 se localizar no centríolo mãe nesta fase do ciclo celular, que parece ser o sinalizador do evento de clivagem nas células de mamífero, fortalece a hipótese de que existe possivelmente uma função associada aos centríolos em telofase que está inibida (ou pelo menos reduzida) nas células sem Mob4. É também muito interessante lembrar que fenótipo de defeito de citocinese observado foi apenas descrito para a centriolina e para a Cdc14A. Se o mecanismo de saída de mitose estiver conservado, pelo menos em parte em eucariotas superiores, a proteína CDC14 encontrar-se-á “abaixo” de hsMob4(A&B). Curiosamente, e olhando para os resultados de separação de centríolos, os fenótipos são os mesmos para a sobreexpressão de Cdc14A e para a depleção de hsMob4(A&B), abrindo a possibilidade de a hsMob4 ser também em eucariotas superiores um regulador da Cdc14A.

8.2 As hsMob4 e o movimento celular

O resultado mais inesperado obtido devido à depleção de hsMob4(A&B) foi a aquisição de mobilidade celular. A análise dos resultados apresentados não permite obter uma resposta que explique a(s) causa(s) deste aumento de mobilidade adquirido pelas células sem hsMob4.

No entanto, a força promotora da mobilidade celular é atingida através da reorganização do citoesqueleto de actina, e esta é regulada pela família das GTPases tipo Rho. Uma das proteínas que se verificou estar envolvida na migração celular é a cinase ROCK, pensando-se que a ROCK regule a migração celular, em parte, por promover a contracção da actina (revisto em Riento & Ridley, 2003). Interessantemente, a cinase ROCK, é uma cinase tipo Dbf2, sendo a Dbf2 a cinase que interage com a scMob1. Além disso, em células humanas a Rock também se localiza entre os centríolos e a sua inibição (com Y-27632) ou depleção (por RNAi) causa também a perda de coesão dos centríolos. Desta forma uma das hipóteses para explicar a mobilidade celular observada seria a existência de uma interacção entre as Mob4 e a Rock, e que a depleção de hsMob4 fosse afectar a actividade desta cinase (ROCK).

Mas, por outro lado, não se pode eliminar a hipótese de que o movimento observado seja resultado directo de uma desorientação dos centríolos. Se os centríolos se moverem “aleatoriamente” dentro da célula, poderão polarizar o citoesqueleto, e esta polarização poderá dirigir/provocar o movimento celular. Estudos recentes indicam que os citoesqueletos

de microtúbulos e de actina não são, como se pensava, duas entidades independentes na célula. Observou-se em neurónios, a existência de interligações entre os microtúbulos e os filamentos de actina, e também que proteínas inicialmente identificadas como MAPs (Microtubule Associated Protein) eram capazes de promover *in vitro* o entre-cruzamento entre filamentos de actina e microtúbulos (revisto em Goode *et al.*, 2000). Assim, a questão actual não é se essas duas estruturas interagem mas como é que interagem. Nas células em migração as protusões de membrana são impulsionadas pela actina e não necessitam de microtúbulos. No entanto, o movimento direccionado necessita de microtúbulos que estejam num estado de polimerização específico (revisto em Goode *et al.*, 2000). Assim no caso da depleção de hsMob4, a separação dos centríolos poderá originar a polarização e polimerização dos microtúbulos para que facilitem a formação de protusões celulares e desta forma, impulsionem o movimento. Para além disso, se os centríolos estiverem à *deriva* dentro da célula, fazendo movimento erráticos, com uma frequente mudança de direcção, esta poderá originar a variação da direcção de polarização do citoesqueleto celular, o que por sua vez poderia explicar a enorme variação observada na direcção do movimento. De acordo com o trabalho de Piel *et al.* (2000) quando os centríolos estão separados, é o centríolo mãe que organiza a rede microtubular, enquanto que o centríolo filho se movimenta aparentemente ao acaso no citoplasma. Células sem Mob4 podem possuir um centríolo mãe que também se movimenta ao acaso. Este movimento do centríolo mãe poderia polarizar as células e seria responsável pelo movimento celular. Em concordância com esta hipótese, já se descreveu a capacidade de o centríolo mãe ter um movimento bastante aleatório no final da telofase e imediatamente após a clivagem, após a inibição de ROCK (com Y-27632) (Chevrier *et al.*, 2002).

8.3 Possíveis parceiros moleculares de hsMob4

Neste trabalho não se identificaram parceiros moleculares das hsMob4. No entanto resultados preliminares obtidos no nosso laboratório (Tavares, resultados não publicados) indicam que as hsMob4 se associam a uma actividade cinásica mitótica. A estrutura molecular da hsMob4B sugere que esta proteína se possa associar a cinases, e que o domínio de interacção com as cinases tipo Dbf2 se manteve conservado das leveduras ao Homem (Stavridi *et al.*, 2003). Apesar de não existir um homólogo óbvio de Dbf2 em humanos, existem outras proteínas para além da Rock que são definidas como sendo cinases tipo Dbf2, sendo elas as cinases tipo LATS/WARTS e as cinases tipo NDR. Assim, e tendo em conta a actividade cinásica observada associada a Mob4, não será surpreendente se as hsMobs4 se associarem a cinases humanas tipo Dbf2. O facto de se observar que a

depleção da cinase Rock tem um efeito nos centríolos semelhante ao descrito para a depleção da Mob4(A&B) faz de ROCK um candidato atractivo a parceiro molecular.

8.4 Funções celulares diferentes para hsMob4A e hsMob4B?

As proteínas hsMob4A e hsMob4B revelaram surpreendentemente terem efeitos fenotípicos diferentes aquando da sua sobreexpressão ou da sua depleção.

A sobreexpressão da hsMob4a e da hsMob4B provoca morte celular, aumento de células binucleadas e alteração da estrutura dos centrossomas. Para além disso, observou-se que a sobreexpressão de hsmob4A tem como fenótipo principal uma paragem em metafase, e que a sobreexpressão de hsMob4B tem como fenótipo principal o colapsar dos fusos. A análise dos efeitos de RNAi simples indicou que ambas as proteínas estavam envolvidas na citocinese, visto que se observou em ambos os casos, atrasos no evento de clivagem. No entanto, detectaram-se diferenças fenotípicas significativas que indicam que a hsMob4A será a principal responsável pelo aumento de células binucleadas, e que, a hsMob4B será mais importante para a coesão dos centríolos. É de referir que, estas proteínas parecem cooperar para a coesão dos centríolos, visto que após a depleção dupla se observa um aumento sinérgico na percentagem de células com os dois centríolos separados.

Estes resultados foram surpreendentes, pois apontam para funções ligeiramente diferentes e especializadas para estas duas proteínas. As hsMob4 não são no entanto as únicas proteínas de uma mesma família com funções celulares diferentes, um exemplo é a fosfatase Cdc14. Em humanos as duas proteínas tipo Cdc14A e B têm localizações celulares diferentes e possivelmente funções diferentes. A Cdc14B localiza-se no nucléolo em interfase (Kaiser *et al.*, 2002), e a Cdc14A observa-se nos centrossomas em interfase, diminuindo a sua acumulação nos polos do fuso em células mitóticas (Kaiser *et al.*, 2002; Mailand *et al.* 2002). Sabe-se que a sobreexpressão de Cdc14A causa separação de centrossomas e defeitos em citocinese (Kaiser *et al.*, 2002; Mailand *et al.* 2002), enquanto que a depleção de Cdc14A por RNAi impede a separação dos centrossomas provocando também defeitos de citocinese. Por outro lado a sobreexpressão de Cdc14B não parece ter efeitos óbvios nas células (Mailand *et al.* 2002). Como já foi referido, a Cdc14 de *S. cerevisiae* pertence à mesma via de sinalização que a scMob1. Dado que em humanos a Cdc14A e a Cdc14B têm funções diferentes, não é difícil pensar que as proteína Mob4A e Mob4B humanas tenham também funções diferentes/especializadas.

Mas, se estas proteínas têm 96% de identidade, e apenas 9 aminoácidos de diferença, como se poderá então explicar os diferentes resultados obtidos para ambas? A resposta pode estar numa pequena sequência de 4 aminoácidos na hsMob4A (PKYE) e que

não está conservada na hsMob4B. De referir que esta sequência não se encontra nas leveduras *S. pombe* e *S. cerevisiae*, mas no entanto é detectada em *Drosophila*. Esta é uma sequência consensus de sumolização. A sequência consensus de sumolização é Ψ KXE, onde Ψ é um aminoácido hidrofóbico, K é a lisina aceitadora, X é um aminoácido qualquer e E é um ácido glutâmico (Sampson *et al.*, 2001) (na sequência da hsMob4B a lisina aceitadora foi substituída por uma arginina). Entre os processos celulares que se encontram regulados pela sumolização encontram-se o transporte nuclear, a regulação transcripcional, a segregação cromossómica e o controlo do ciclo celular. Muito interessantemente, a análise da estrutura 3D hsMob4 (Stavridi *et al.*, 2003) sugere que o local de sumolização está exposto na superfície da proteína, e numa região em que se encontra fisicamente próximo do átomo de zinco que é suposto conferir estabilidade à estrutura de hsMob4 (Figura 8.1). Assim, é de facto altamente sugestivo que este local de sumolização esteja na base das diferenças observadas entre os dois Mob4, e que a sumolização de hsMob4A possa induzir mudanças conformacionais na estrutura desta proteína que, poderão ser responsáveis pela associação a parceiros moleculares diferentes, com consequentes funções celulares diferentes.

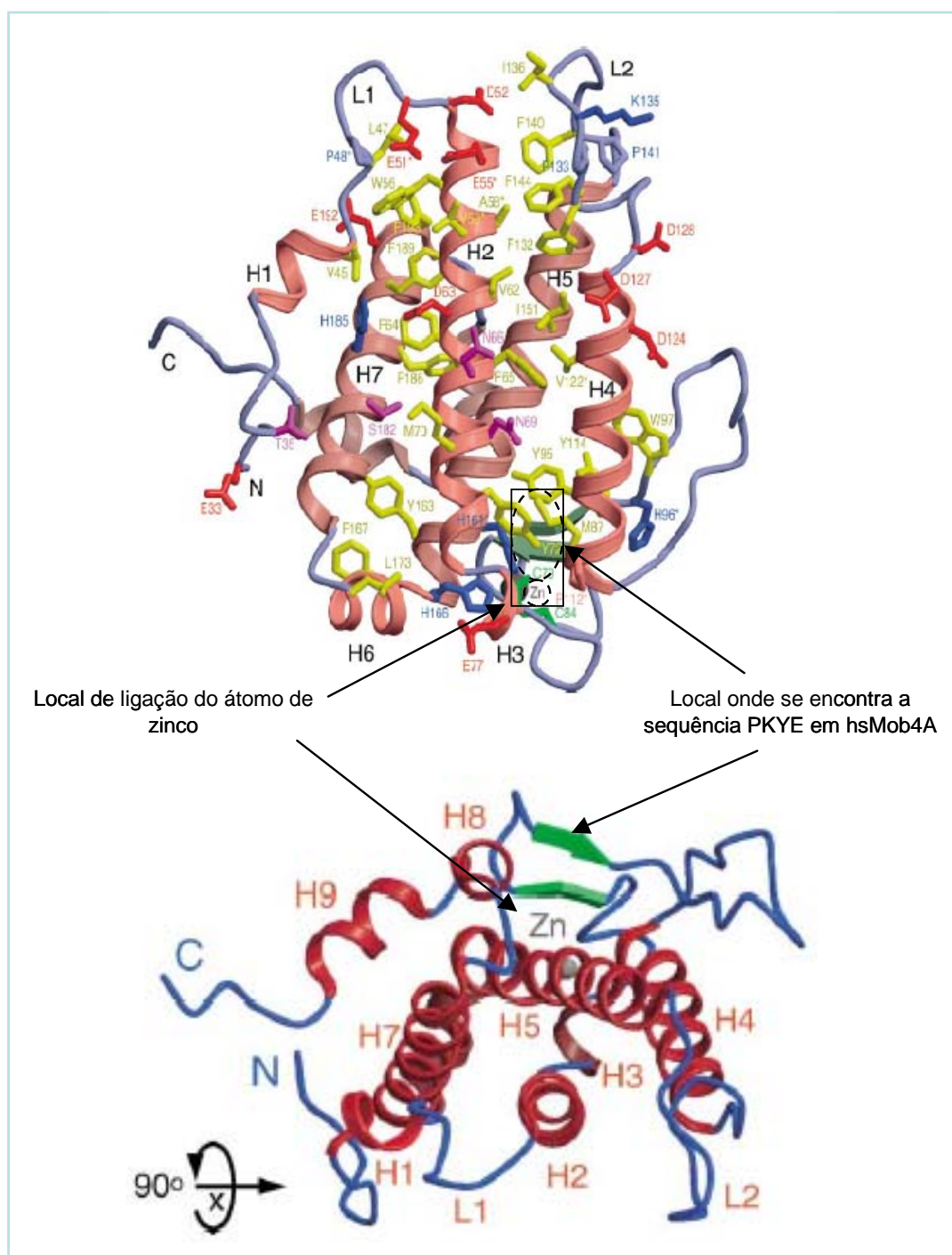


Figura 8.1 – Estrutura tridimensional de *hsMob4B*. Encontram-se salientados o local de ligação ao átomo de Zinco e a sequência PKYE (sequência consenso de sumolização). Estrutura 3D retirada de Stavridi *et al.*, (2003).

9. Perspectivas

Os resultados apresentados neste trabalho levantam ainda muitas questões relativas à função das proteínas hsMob4.

Uma das conclusões que se retirou deste trabalho foi que as Mobs4 humanas são necessárias para a citocinese. Como referido, os hsMobs são homólogos de genes homónimos nas leveduras *S. cerevisiae* e *S. pombe* e, pertencem a cascatas de sinalização que controlam a saída de mitose e a citocinese nestes mesmos organismos. No entanto, não se sabe ainda se uma cascata semelhante existe ou não em mamíferos. A resposta definitiva a esta questão passará então pela a pesquisa de interações entre as proteínas Mobs e os outros componentes de MEN e de SIN que se encontram conservados no genoma humano.

Os resultados obtidos na tese não permitem também obter uma resposta quanto ao mecanismo de falha de citocinese observado após a depleção das hsMobs4. No entanto, estes sugerem que a resposta a essa questão poderá estar no comportamento do centríolo mãe em telofase pois: a imunolocalização das hsMob4 indica que estas se localizam no centríolo mãe em telofase, e ainda, a separação de centríolos observada em células indica que estes não têm um comportamento normal. A citocinese pode, após a depleção de hsMob4, falhar porque os centríolos são incapazes de sinalizar a clivagem. Existem assim três hipóteses possíveis para explicar a falha da citocinese:

- a) O centríolo mãe perde a orientação não “sabendo” onde está o midbody.
- b) O centríolo mãe “sabe” onde está o midbody mas é incapaz de se mover até este local.
- c) O centríolo mãe mover-se-á e até ao midbody, mas é incapaz de sinalizar a clivagem.

A análise do comportamento dos centríolos por microscopia de tempo real indicaria então se o movimento do centríolo mãe é ou não afectado após a depleção das Mobs4.

Uma outra conclusão que se retirou destes estudos foi que as proteínas hsMob4A e hsMob4B funcionam em células HeLa como um elemento da coesão dos centríolos. Assim, para confirmar se as hsMobs4 são de facto o elemento determinante para essa coesão dever-se-ia realizar a localização de hsMob4 por microscopia electrónica e observar se este se localiza entre os dois centríolos, e se estabelece uma ligação entre estes (como sugerido pelos resultados de imunofluorescência).

Para se perceber de que forma é que as hsMobs4 actuam como elementos de coesão dos centríolos, dever-se-á ainda estudar a possível interacção entre as proteínas Mobs4 e outras proteínas que se sabe serem importantes para esta coesão, como por exemplo: a RanBP1, a CP110, a Cdk2, a Nek2, a Rock e a Cdc14A (Fiore *et al.* 1999; Chen *et al.* 2002; Meraldi & Nigg, 2001; Fry *et al.*, 1998; Faragher & Fry, 2003; Chevrier *et al.*,

2002; Mailand *et al.*, 2002). Após a identificação de uma (ou mais) destas proteínas como um parceiro molecular das hsMob4, analisar-se-ia de que forma é que as hsMob4 actuam para estabelecer a coesão dos centríolos. Essa análise poderia ser realizada observando se o parceiro molecular identificado está deslocado após o RNAi de hsMob4, e ainda (caso se identifique uma cinase) analisar a actividade cinásica desta mesma proteína nos extractos de células sem Mob.

Duas das proteínas referidas em cima, a Cdk2 e a CP110, estão também envolvidas na duplicação dos centrossomas (Chen *et al.* 2002). De lembrar que a scMob1 foi identificada por um rastreio genético na pesquisa de proteínas que interagissem com a scMps1 (Luca & Winey, 1998). A scMps1 é uma proteína que tem duas funções: é importante para a duplicação do SPB e para o ponto-de-controlo de montagem do fuso. Assim, é possível que as hsMob4 possam ter um papel na duplicação dos centrossomas. Uma forma de testar esta hipótese seria analisar a duplicação dos centrossomas após o bloqueio da duplicação do DNA com hidroxiureia¹. Um tratamento prolongado com hidroxiureia permite que se dêem múltiplos ciclos de duplicação dos centrossomas sem ocorrer duplicação do DNA ou citocinese. Assim, poder-se-ia, em células deplectadas de hsMob4(A&B), bloquear a duplicação de DNA com hidroxiureia e observar se após este bloqueio há também um bloqueio, na duplicação dos centrossomas. Se esse for o caso, então possivelmente as hsMob4 estarão envolvidas na duplicação dos centrossomas.

É importante lembrar que apesar de se ter observado fenótipos que indicam que as hsMob4 estão envolvidas na citocinese, na coesão dos centríolos e na mobilidade celular, não se sabe que parceiros moleculares das Mobs contribuem para que estas funções sejam atingidas. Assim, a identificação de interactuantes com a hsMob4A e com a hsMob4B ajudará à elucidação do mecanismo molecular destas proteínas. Uma das hipóteses possíveis para identificar esses interactuantes seria um ensaio de duplo híbrido. Resultados preliminares obtidos no nosso laboratório sugerem que as hsMob4 se associam a cinases mitóticas. Estes resultados estão de acordo com o descrito para a Mob1 de levedura, que se sabe associar-se a cinases tipo Dbf2 para executarem as funções de saída de mitose e citocinese (Komarnitsky, *et al.*, 1998; Hou, *et al.*, 2000; Salimova, *et al.*, 2000). Logo, candidatos óbvios a parceiros moleculares das Mobs humanas seriam as cinases tipo Dbf2 que existem no genoma humano: como a NDR, as cinases tipo LATS/WARTS e as cinases tipo ROCK (revisto em Tamaskovic *et al.*, 2003). A pesquisa directa de interacções entre as

¹ O ensaio da duplicação dos centrossomas após um bloqueio da replicação de DNA com hidroxiureia baseia-se no facto de que em sistemas embrionários e em células somáticas, ser possível desacoplar a replicação do DNA da duplicação dos centrossomas utilizando-se inibidores da síntese de DNA.

Mobs e as cinases tipo Dbf2, realizando-se por exemplo ensaios de co-imunoprecipitação, será pois importante.

A sobreexpressão de hsMob4A originou, uma paragem em metafase. Existem pelo menos duas hipóteses possíveis (não exclusivas) para a explicação dessa observação: a sobreexpressão de hsMob4A pode induzir uma sobre activação do ponto-de-controlo de montagem do fuso, ou pode estabilizar os microtúbulos.

Se após a sobreexpressão de hsMob4A o ponto-de-controlo de montagem do fuso estiver sobre activado, então nas células bloqueadas em metafase, deverá ser possível detectar, por imunolocalização, os componentes do ponto-de-controlo ainda ligados aos cinetocoros.

Para testar se a hsMob4A está directamente envolvida na estabilização dos microtúbulos poder-se-ia realizar o seguinte ensaio: incubar hsMob4A com tubulina pura e permitir a polimerização do microtúbulos após o que se testaria se estes, devido à presença da Mob4A, são mais resistentes a tratamentos de despolimerização do que microtúbulos formados apenas com tubulina. Caso a hsMob4A por si só não torne os microtúbulos mais estáveis, poder-se-ia incubar a tubulina pura com a hsMob4A e com MAPs, e da mesma forma, testar se os microtúbulos neste último caso serão mais estáveis a tratamentos despolimerizadores.

Seria ainda muito interessante determinar a que se deve as diferenças observadas para as proteínas hsMob4A e hsMob4B. Uma das hipóteses possíveis é, como referido na discussão, a sequência de sumolização existente em hsMob4A mas que não existe em hsMob4B. Assim, um ensaio directo para verificar se hsMob4A é somulizado ou não poderia começar por elucidar esta questão. Se este for o caso, poder-se-ia então mutar a sequência da hsMob4A PKYE para PRYE, isto é substituir a lisina por arginina e desta forma, retirar a sequência de sumolização de hsMob4A. Uma vez tendo a hsMob4A sem a sequência consensos de sumolização poder-se-ia sobreexpressar esta proteína e observar se a sobreexpressão de hsMob4A mutado iria provocar o mesmo efeito fenotípico que a sobreexpressão da hsMob4B. Caso não se observar a alteração de fenótipo, então poder-se-ia realizar mutações dirigidas para os restantes aminoácidos que são diferentes, de forma a perceber qual deste(s) é/são responsável(eis) pelo diferente comportamento das Mobs4 humanas.

Por ultimo, é importante referir que quase todos os estudos apresentados foram realizados em células HeLa. Assim, seria importante determinar se os fenótipos observados após a sobreexpressão e depleção das Mobs4 se observarão noutras linhas celulares. Mas esse será o objectivo de outra dissertação.

10. Bibliogafia

Bibliografía

- Abrieu, A., Magnaghi-Jaulin, L., Kahana, J. A., Peter, M., Castro, A., Vigneron, S., Lorca, T. (2001). **Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint.** *Cell*, **106**:83-93.
- Adams, R. R., Maiato, H., Earnshaw, W. C. & Carmena, M. (2001). **Essential roles of *Drosophila* inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation.** *J. Cell Biol.*, **153**: 865-880.
- Adams, R. R., Tavares, A. A., Salzberg, A., Bellen, H. J. & Glover, D.M. (1998). **Pavarotti encodes a kinesin-like protein required to organize the central spindle and contractile ring for cytokinesis.** *Genes & Dev.*, **12**: 1483-1494.
- Andersen, S. S. (2000). **Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and Stathmin/Op18.** *Trends Cell Biol.*, **10**: 261-267.
- Andersen, S. S. & Wittmann, T. (2002). **Toward reconstitution of in vivo microtubule dynamics in vitro.** *Bioessays*, **24**: 305-307.
- Asakawa, K., Yoshida, S., Otake, F. & Toh-e A. (2001). **A novel functional domain of Cdc15 kinase is required for its interaction with Tem1 GTPase in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genetics*, **157**:1437-1450.
- Bahler, J., Steever, A. B., Wheatley, S., Wang, Y., Pringle, J. R., Gould, K. L. & McCollum D. (1998). **Role of polo kinase and Mid1p in determining the site of cell division in fission yeast.** *J. Cell Biol.*, **143**: 1603-1616
- Baillat, G., Moqrigh, A., Castets, F., Baude, A., Bailly, Y., Benmerah, A., & Monneron, A. (2001). **Molecular cloning and characterization of phocein, a protein found from the golgi complex to dendritic spines.** *Moll. Biol. Cell*, **12**: 663-673.
- Bardin, A. J. & Amon, A. (2001). **Men and sin: what's the difference?** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**:815-826.
- Bardin, A. J., Visintin, R. & Amon A. (2000). **A mechanism for coupling exit from mitosis to partitioning of the nucleus.** *Cell*, **102**:21-31.
- Bembenek, J & Yu, H. (2001). **Regulation of the anaphase-promoting complex by the dual specificity phosphatase human Cdc14a.** *J. Biol. Chem.*, **276**:48237-48242.
- Bi, E., Maddox, P., Lew, D. J., Salmon, E. D., McMillan, J. N., Yeh, E. & Pringle, J. R. (1998). **Involvement of an actomyosin contractile ring in *Saccharomyces cerevisiae* cytokinesis.** *J. Cell Biol.*, **142**: 1301-1312.
- Bornens M & Moudjou M. (1999). **Studying the composition and function of centrosomes in vertebrates.** *Methods Cell Biol.*, **61**:13-34.
- Boyne, J. R., Yosuf, H.M., Bieganowski, P., Brenner, C. & Price, C. (2000). **Yeast myosin light chain, Mlc1p, interacts with both IQGAP and class II myosin to effect cytokinesis.** *J. Cell Sci.*, **113**: 4533-4543.
- Briggs, M. W. & Sacks, D. B. (2003). **IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation.** *EMBO Rep.*, **4**: 571-574.
- Burke, D. J. & Stukenberg, P. T. (2003). **The quest for the holy "G" of chromosomal passengers.** *Dev. Cell*, **5**: 187-188.

- Carvalho, A., Carmena, M., Sambade, C., Earnshaw, W. C. & Wheatley, S. P. (2003). **Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells.** *J. Cell Sci.*, **116**: 2987-2998.
- Cerutti, L. & Simanis, V. (1999). **Asymmetry of the spindle pole bodies and spg1p GAP segregation during mitosis in fission yeast.** *J. Cell Sci.*, **112**:2313-2321.
- Chen, J., Jin, S., Tahir, S. K., Zhang, H., Liu, X., Sarthy, A. V., McGonigal, T. P., Liu, Z., Rosenberg, S. H. & Ng S. C. (2003). **Survivin enhances Aurora-B kinase activity and localizes Aurora-B in human cells.** *J. Biol. Chem.*, **278**: 486-490.
- Chen, Z., Indjeian, V. B., McManus, M., Wang, L., & Dynlacht, B. D. **CP110, a cell cycle-dependent CDK substrate, regulates centrosome duplication in human cells.** *Dev. Cell*, 2002, **3**: 339-350.
- Chevrier, V., Piel, M., Collomb, N., Saoudi, Y., Frank, R., Paintrand, M., Narumiya, S., Bornens, M., & Job, D. (2002). **The Rho-associated protein kinase p160ROCK is required for centrosome positioning.** *J. Cell Biol.*, **157**: 807-817.
- Clute, P., & Pines, J. (1999). **Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase.** *Nature Cell Biol.*, **1**: 82-87.
- Cohen-Fix, O., Peters, J. M., Kirschner, M. W. & Koshland, D. (1996). **Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p.** *Genes & Dev.*, **10**: 3081-3093.
- Colman-Lerner, A., Chin, T. E. & Brent R. (2001). **Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates.** *Cell*, **107**:739-750.
- Compton, D. A. (2000). **Spindle assembly in animal cells.** *Annu Rev Biochem.*, **69**: 95-114.
- Cooke, C. A., Heck, M. M. & Earnshaw, W. C. (1987). **The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis.** *J. Cell Biol.*, **105**: 2053-2067.
- DeMarini, D. J., Adams, A. E., Fares, H., De Virgilio, C., Valle, G., Chuang, J. S. & Pringle, J. R. (1997). **A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall.** *J. Cell Biol.*, **139**: 75-93.
- Demeter, J. & Sazer, S. **imp2, a new component of the actin ring in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.** *J. Cell Biol.*, 1998, **143**: 415-427.
- den Elzen N. & Pines, J. (2001). **Cyclin A Is Destroyed in Prometaphase and Can Delay Chromosome Alignment and Anaphase.** *J. Cell Biol.*, **153**: 121-135.
- Desai, A. & Mitchison, T. J. (1997). **Microtubule polymerization dynamics.** *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **13**: 83-117.
- Ditchfield, C., Johnson, V. L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N. & Taylor, S. S. (2003). **Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores.** *J. Cell Biol.*, **161**: 267-280.
- Doxsey, S. (2001). **Re-evaluating centrosome function.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**:688-98.
- Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D. & Sharp, P. A. (2003). **Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**: 457-465.
- Eckley, D.M., Ainsztein, A.M., Mackay, A.M., Goldberg, I.G. & Earnshaw, W. C. (1997). **Chromosomal proteins and cytokinesis: patterns of cleavage furrow formation and**

- inner centromere protein positioning in mitotic heterokaryons and mid-anaphase cells.** *J. Cell Biol.*, **136**: 1169-1183.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. (2001). **Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.** *Nature*, **418**: 494-498.
- Eng, K., Naqvi, N.I., Wong, K.C. & Balasubramanian, M. K. (1998). **Rng2p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the actomyosin ring and the spindle pole body.** *Curr. Biol.*, **8**: 611-621.
- Fankhauser, C., Marks, J., Reymond, A. & Simanis, V. (1993). **The *S. pombe* cdc16 gene is required both for maintenance of p34cdc2 kinase activity and regulation of septum formation: a link between mitosis and cytokinesis?** *EMBO J.*, **12**:2697-2704.
- Faragher A. J. & Fry, A. M. (2003). **Nek2A kinase stimulates centrosome disjunction and is required for formation of bipolar mitotic spindles.** *Moll. Biol. Cell*, **14**: 2876-2889.
- Farr, K. A. & Cohen-Fix, O. (1999). **The metaphase to anaphase transition: a case of productive destruction.** *Eur. J. Biochem.*, **263**: 14-19.
- Fiore, B., Ciciarello, M., Mangiacasale, R., Palena, A., Tassin, A. M., Cundari, E. & Lavia, P. (2003). **Mammalian RanBP1 regulates centrosome cohesion during mitosis.** *J. Cell Sci.*, **116**: 3399-3411.
- Fry, A. M., Meraldi, P. & Nigg, E. A. (1998). **A centrosomal function for the human Nek2 protein kinase, a member of the NIMA family of cell cycle regulators.** *EMBO J.*, **17**: 470-481.
- Fry, A. M., Mayor, T., Meraldi, P., Stierhof, Y. D., Tanaka, K., & Nigg, E. A. (1998 b). **C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2.** *J. Cell Biol.*, **141**: 1563-1574.
- Fryxell, K. J. (1996). **The coevolution of gene family trees.** *Trends Genet.*, **12**:364-369.
- Funabiki, H., Yamano, H., Kumada, K., Nagao, K., Hunt, T. & Yanagida, M. (1996). **Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast.** *Nature*, **381**: 438-441.
- Geymonat, M., Jensen, S. & Johnston, L. H. (2002). **Mitotic exit: the Cdc14 double cross.** *Curr. Biol.*, **12**:R482- R484.
- Geymonat, M., Spanos, A., Walker, P. A., Johnston, L. H. & Sedgwick, S.G. (2003). **In vitro regulation of budding yeast Bfa1/Bub2 GAP activity by Cdc5.** *J. Biol. Chem.*, **278**:14591-14594.
- Glötzer M. (2003). **Cytokinesis: progress on all fronts.** *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**:684-690.
- Glötzer, M., Murray, A. W. & Kirschner, M.W. (1991). **Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway.** *Nature*, **349**: 132-138.
- Goode, B. L., Drubin, D. G. & Barnes, G. (2000). **Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons.** *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**: 63-71.
- Goto, H., Yasui, Y., Kawajiri, A., Nigg, E. A., Terada, Y., Tatsuka, M., Nagata, K. & Inagaki, M. (2003). **Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process.** *J. Biol. Chem.*, **278**: 8526-8530.
- Gromley, A., Jurczyk, A., Sillibourne, J., Halilovic, E., Mogensen, M., Groisman, I., Blomberg, M. & Doxsey, S. (2003). **A novel human protein of the maternal centriole is required for the final stages of cytokinesis and entry into S phase.** *J. Cell Biol.*, **161**: 535-545.

- Gruneberg, U., Campbell, K., Simpson, C., Grindlay, J. & Schiebel, E. (2000). **Nud1p links astral microtubule organization and the control of exit from mitosis.** *EMBO J.*, **19**: 6475-6488.
- Gruneberg, U., Glotzer, M., Gartner, A. & Nigg E. A. (2002). **The CeCDC-14 phosphatase is required for cytokinesis in the *Caenorhabditis elegans* embryo.** *J. Cell Biol.*, **158**:901-914.
- Guertin, D.A., Trautmann, S. & McCollum, D. (2002). **Cytokinesis in eukaryotes.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **66**: 155-178.
- Guertin, D. A., Chang, L., Irshad, F., Gould, K. L & McCollum D. (2000). **The role of the sid1p kinase and cdc14p in regulating the onset of cytokinesis in fission yeast.** *EMBO J.*, **19**:1803-1815.
- Gu, X., Wang, Y. & Gu, J. (2002). **Age distribution of human gene families shows significant roles of both large- and small-scale duplication in vertebrate evolution.** *Nat. Genet.*, **31**: 205-209.
- Hannak, E., Kirkham, M., Hyman, A. A. & Oegema, K. (2001). **Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*.** *J. Cell Biol.*, **155**: 1109–1115.
- He, X., Jones, M. H., Winey, M., Sazer, S. (1998). **mph1, a member of the Mps1-like family of dual specificity protein kinases, is required for the spindle checkpoint in *S. pombe*.** *J. Cell Sci.*, **111**: 1635-1647.
- Heald, R., Tournebize, R., Blank, T., Sandaltzopoulos, R., Becker, P., Hyman, A. & Karsenti, E. (1996). **Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts.** *Nature*, **382**, 420 - 425
- Hinchcliffe, E. H., Miller, F. J., Cham, M., Khodjakov, A., & Sluder, G. (2001). **Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase.** *Science*, **291**:1547-1550.
- Hir, L. H., Nott, A. & Moore, J.M. (2003). **How introns influence and enhance eukaryotic gene expression.** *Trends Biochem. Sci.*, **28**: 215-220.
- Hirano, T. (2000). **Chromosome cohesion, condensation, and separation.** *Annu. Rev. Biochem.*, **69**: 115-144.
- Howe, J. A., Howell, M., Hunt, T., & Newport. J. W. (1995). **Identification of a developmental timer regulating the stability of embryonic cyclin A and a new somatic A-type cyclin at gastrulation.** *Genes & Dev.*, **9**:1164-1176.
- Hou, M. C., Salek, J. & McCollum, D. (2000). **Mob1p interacts with the Sid2p kinase and is required for cytokinesis in fission yeast.** *Curr. Biol.*, **10**:619-622.
- Hou, M. C., Wiley, D. J., Verde, F. & McCollum, D. (2003). **Mob2p interacts with the protein kinase Orb6p to promote coordination of cell polarity with cell cycle progression.** *J. Cell Sci.*, **116**:125-135.
- Hu, F., Wang, Y., Liu, D., Li, Y., Qin, J., & Elledge S. J. (2001). **Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP complex by Cdc5 and cell cycle checkpoints.** *Cell*, **107**:655-665.
- Hwa – Lim, H., Yeong, F. M., Surana, U. (2003). **Inactivation of mitotic kinase triggers translocation of MEN components to mother-daughter neck in yeast.** *Mol. Biol. Cell.*, **14**:4734-4743.
- Kaiser, B. K., Zimmerman, Z. A., Charbonneau, H. & Jackson, P. K. (2002). **Disruption of centrosome structure, chromosome segregation, and cytokinesis by misexpression of human Cdc14A phosphatase.** *Mol. Biol. Cell*, **13**: 2289-2230.

- King, K. L. & Cidlowski, J. A. (1998). **Cell cycle regulation and apoptosis.** *Annu. Rev. Physiol.*, **60**: 601–617.
- Kamei, T., Tanaka, K., Hihara, T., Umikawa, M., Imamura, H., Kikyo, M., Ozaki, K. & Takai Y. (1998). **Interaction of Bnr1p with a novel Src homology 3 domain-containing Hof1p. Implication in cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J. Biol. Chem.*, **273**: 28341-28345.
- Khodjakov, A., Cole, R.W., Oakley, V., R. & Rieder, C. L. (2000).**Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates.** *Curr. Biol.*, **10**:59-67.
- Khodjakov, A. & Rieder, C. L. (2001). **Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression.** *J. Cell Biol.*, **153**: 317–329.
- Kinoshita, M., Kumar, S., Mizoguchi, A., Ide, C., Kinoshita, A., Haraguchi, T., Hiraoka, Y. & Noda M. (1997). **Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures.** *Genes & Dev.*, **11**: 1535-1547.
- Komarnitsky, I. S.,Chiang, C. Y. , Luca, C. F., Chen, J., Toyn, H. J., Winey, M., Johnston, H. L. and Denis, L. C. (1998). **DBF2 protein kinase binds to and acts through the cell cycle-regulated MOB1 protein.** *Mol. Cell Biol.*, **18**: 2100-2107.
- Komarnitsky S.I., Chiang, Y. C. , Luca F. C., Chen, J., Toyn, J. H., Winey, M., Johnston, L. H., Lee, S. E., Frenz, L. M., Wells, N. J., Johnson, A. L., & Johnston, L. H. (2001). **Order of function of the budding-yeast mitotic exit-network proteins Tem1, Cdc15, Mob1, Dbf2, and Cdc5.** *Curr. Biol.*, **11**: 784-788.
- Kosako, H., Yoshida, T., Matsumura, F., Ishizaki, T., Narumiya, S. & Inagaki, M. (2000). **Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezrin/radixin/moesin proteins at the cleavage furrow.** *Oncogene*, **19**: 6059-6064.
- Kuriyama, R., Gustus, C., Terada, Y., Uetake, Y. & Matuliene, J. (2002). **CHO1, a mammalian kinesin-like protein, interacts with F-actin and is involved in the terminal phase of cytokinesis.** *J. Cell Biol.*, **156**:783-790.
- Jaspersen, S. L. & Morgan, D. O. (2000). **Cdc14 activates cdc15 to promote mitotic exit in budding yeast.** *Curr. Biol.*, **10**:615-618.
- Jensen, S. & Johnston, L. H. (2002). **Complexity of mitotic exit.** *Cell Cycle*, **1**:300-303.
- Larsson, N., Marklund, U., Gradin, H. M., Brattsand, G., & Gullberg, M. (1997). **Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis.** *Mol. Cell. Biol.*, **17**: 5530-5539.
- Lee, S. E., Frenz, L. M., Wells, N.J., Johnson, A. L. & Johnston L. H. (2001). **Order of function of the budding-yeast mitotic exit-network proteins Tem1, Cdc15, Mob1, Dbf2, and Cdc5.** *Curr. Biol.*, **11**:784-788.
- Le Goff, X., Woollard, A. & Simanis V. (1999). **Analysis of the cps1 gene provides evidence for a septation checkpoint in *Schizosaccharomyces pombe*.** *Mol. Gen. Genet.*, **262**:163-172.
- Lens, S. M., Wolthuis, R. M., Klompmaker, R., Kauw, J., Agami, R., Brummelkamp, T., Kops, G. & Medema, R. H. (2003). **Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension.** *EMBO J.*, **22**: 2934-2947.
- Lew, D.J. & Burke, D. J. (2003). **The spindle assembly and spindle position checkpoints.** *Annu. Rev. Genet.*, **37**:251–282
- Li, C., Furge, K. A., Cheng, Q. C. & Albright, C. F. (2000a). **Byr4 localizes to spindle-pole bodies in a cell cycle-regulated manner to control Cdc7 localization and septation in fission yeast.** *J. Biol. Chem.*, **275**:14381-14387.

- Li, L., Ernstring, B. R., Wishart, M. J., Lohse, D. L. & Dixon, J. E. (1997). **A family of putative tumor suppressors is structurally and functionally conserved in humans and yeast.** *J. Biol. Chem.*, **272**:29403-29406.
- Li, L., Ljungman, M., & Dixon, J. E. (2000). **The human Cdc14 phosphatases interact with and dephosphorylate the tumor suppressor protein p53.** *J. Biol. Chem.*, **275**: 2410-2414.
- Li, R. (1999). **Bifurcation of the mitotic checkpoint pathway in budding yeast.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**:4989-4994.
- Li, Y., Pei, J., Xia, H., Ke, H., Wang, H. & Tao, W. (2003). **Lats2, a putative tumor suppressor, inhibits G1/S transition.** *Oncogene*, **22**:4398-4405.
- Lippincott, J. & Li, R. (1998). **Dual function of Cyk2, a cdc15/PSTPIP family protein, in regulating actomyosin ring dynamics and septin distribution.** *J. Cell Biol.*, **143**: 1947-1960.
- Lippincott, J. & Li, R. (1998b). **Sequential assembly of myosin II, an IQGAP-like protein, and filamentous actin to a ring structure involved in budding yeast cytokinesis.** *J. Cell Biol.*, **140**: 355-366.
- Liu, J., Wang, H. & Balasubramanian M. K. (2000). **A checkpoint that monitors cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*.** *J. Cell Sci.*, **113**:1223-1230.
- Liu, J., Wang, H., McCollum, D. & Balasubramanian. M. K. (1999). **Drc1p/Cps1p, a 1,3-beta-glucan synthase subunit, is essential for division septum assembly in *Schizosaccharomyces pombe*.** *Genetics*, **153**:1193-1203.
- Longtine, M. S., DeMarini, D. J., Valencik, M. L., Al-Awar, O. S., Fares, H., De Virgilio, C. and Pringle, J. R. (1996). **The septins: roles in cytokinesis and other processes.** *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**: 106-119.
- Luca, F.C. & Winey, M. (1998). **MOB1, an essential yeast gene required for completion of mitosis and maintenance of ploidy.** *Moll. Biol. Cell*, **9**: 29-46.
- Luca, F.C., Manalimody, Kurischko, C., Roof, D.M., Giddings, T. H., & Winey, M. (2001). ***Saccharomyces cerevisiae* Mob1p is required for cytokinesis and mitotic exit.** *Moll. Cell Biol.*, **21**: 6972-6983.
- Mackay, A. M., Ainsztein, A. M., Eckley, D. M., Earnshaw, W. C. (1998). **A dominant mutant of inner centromere protein (INCENP), a chromosomal protein, disrupts prometaphase congression and cytokinesis.** *J. Cell Biol.*, **140**: 991-1002.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K. & Narumiya, S. (1999). **Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase.** *Science*, **285**:895-898.
- Madaule, P., Eda, M., Watanabe, N., Fujisawa, K., Matsuoka, T., Bito, H., Ishizaki, T. & Narumiya S. (1998). **Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis.** *Nature*, **394**: 491-494.
- Mah, A. S., Jang, J., & Deshaies, R. J. (2001). **Protein kinase Cdc15 activates the Dbf2-Mob1 kinase complex.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**: 7325-7330.
- Mailand, N., Lukas, C., Kaiser, B. K., Jackson, P. K., Bartek, J. & Lukas, J. (2002). **Deregulated human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation.** *Nature Cell Biol.*, **4**: 317-322.

- Matulienė, J. & Kuriyama, R. (2002). **Kinesin-like protein CHO1 is required for the formation of midbody matrix and the completion of cytokinesis in mammalian cells.** *Mol. Biol. Cell*, **13**:1832-1845.
- McIntosh, J. R., Grishchuk, E. L. & West, R. R. (2002). **Chromosome-microtubule interactions during mitosis.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **18**:193–219
- Meikrantz, W. & Schlegel, R. (1996). **Suppression of Apoptosis by Dominant Negative Mutants of Cyclin-dependent Protein Kinases.** *J. Biol. Chem.*, **271**: 10205-10209.
- Menssen, R., Neutzner, A., Seufert, W. (2001). **Asymmetric spindle pole localization of yeast Cdc15 kinase links mitotic exit and cytokinesis.** *Curr. Biol.*, **11**:345-350.
- Meraldi, P. & Nigg, E. A. (2001). **Centrosome cohesion is regulated by a balance of kinase and phosphatase activities.** *J. Cell Sci.*, **114**: 3749-3757.
- Michaelis, C., Ciosk, R. & Nasmyth, K. (1997). **Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids.** *Cell*, **91**: 35-45.
- Millward, T., Cron, P. & Hemmings, B. A. (1995). **Molecular cloning and characterization of a conserved nuclear serine(threonine) protein kinase.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**:5022-5026.
- Millward, T. A., Hess, D. & Hemmings, B. A. (1999). **Ndr protein kinase is regulated by phosphorylation on two conserved sequence motifs.** *J. Biol. Chem.*, **274**:33847-33850.
- Minoshima, Y., Kawashima, T., Hirose, K., Tono-zuka, Y., Kawajiri, A., Bao, Y. C., Deng, X., Tatsuka, M., Narumiya, S., May, W. S. Jr., Nosaka, T., Semba, K., Inoue, T., Satoh, T., Inagaki, M. & Kitamura, T. (2003). **Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis.** *Dev. Cell*, **4**: 549-560.
- Modrek, B. & Lee, C. (2002). **A genomic view of alternative splicing.** *Nature Genet.*, **30**: 13-19.
- Mollinari, C., Reynaud, C., Martineau-Thuillier, S., Monier, S., Kieffer, S., Garin, J., Andreassen, P. R., Boulet, A., Goud, B., Kleman, J. P., Margolis, R. L. (2003). **The mammalian passenger protein TD-60 is an RCC1 family member with an essential role in prometaphase to metaphase progression.** *Dev. Cell*, **5**: 295-307.
- Moreno, C.S, Lane, W. S. & Pallas, D. C. (2001). **A mammalian homolog of yeast MOB1 is both a member and a putative substrate of striatin family-protein phosphatase 2A complexes.** *J. Biol. Chem.*, **276**: 24253-24260.
- Musacchio, A. & Hardwick, K. G. (2002). **The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**: 731-741.
- Mulvihill, D. P., Petersen, J., Ohkura, H., Glover, D.M. & Hagan I. M. (1999). **Plo1 kinase recruitment to the spindle pole body and its role in cell division in *Schizosaccharomyces pombe*.** *Mol. Biol. Cell.*, **10**:2771-2785.
- Neufeld, T. P. & Rubin, G. M. (1994). **The *Drosophila* peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins.** *Cell*, **77**: 371-379.
- Nguyen, T.B., Manova, K., Capodiecì, P., Lindon, C., Bottega, S., Wang, X., Refik-Rogers, J., Pines, J., Wolgemuth, D. J. & Koff, A. (2002). **Characterization and expression of mammalian cyclin B3, a prepachytene meiotic cyclin.** *J. Biol. Chem.*, **277**: 41960-41969.
- Nishiyama, Y., Hirota, T., Morisaki, T., Hara, T., Marumoto, T., Iida, S., Makino, K., Yamamoto, H., Hiraoka, T., Kitamura, N. & Saya, H. (1999). **A human homolog of *Drosophila* warts tumor suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis.** *FEBS Lett.*, **459**:159-165.

- Oegema, K. & Mitchison, T. J. (1997). **Rappaport rules: cleavage furrow induction in animal cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**: 4817-4820.
- Ohkura, H., Hagan, I. M. & Glover, D.M. (1995). **The conserved *Schizosaccharomyces pombe* kinase *plp1*, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells.** *Genes & Dev.*, **9**:1059-1073.
- Page, A. M. & Hieter, P. (1999). **The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators.** *Annu. Rev. Biochem.*, **68**: 583-609.
- Paoletti, A. & Chang, F. (2000). **Analysis of *mid1p*, a protein required for placement of the cell division site, reveals a link between the nucleus and the cell surface in fission yeast.** *Mol. Biol. Cell*, **11**: 2757-2773.
- Pereira, G., Hofken, T., Grindlay, J., Manson, C. & Schiebel E. (2000). **The *Bub2p* spindle checkpoint links nuclear migration with mitotic exit.** *Mol. Cell.*, **6**:1-10.
- Pereira, G., Manson, C., Grindlay, J., & Schiebel, E. (2002). **Regulation of the *Bfa1p-Bub2p* complex at spindle pole bodies by the cell cycle phosphatase *Cdc14p*.** *J. Cell Biol.*, **157**:367-379.
- Pereira, G. & Schiebel, E. (2003). **Separase regulates *INCENP-Aurora B* anaphase spindle function through *Cdc14*.** *Science*, **302**:2120-2124.
- Pereira, G., Tanaka, T. U., Nasmyth, K. & Schiebel, E. (2001). **Modes of spindle pole body inheritance and segregation of the *Bfa1p-Bub2p* checkpoint protein complex.** *EMBO J.*, **20**:6359-6370.
- Peters, J. M. (1999). **Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex.** *Exp Cell Res.*, **248**: 339-349.
- Pfleger, C. M. & Kirschner, M. W. (2000). **The *KEN* box: an APC recognition signal distinct from the *D* box targeted by *Cdh1*.** *Genes & Dev.*, **14**: 655-65.
- Piel, M., Nordberg, J., Euteneuer, U. & Bornens, M. (2001). **Centrosome-dependent exit of cytokinesis in animal cells.** *Science*, **291**:1550-1553.
- Piel, M., Meyer, P., Khodjakov, A., Rieder, C. L. & Bornens, M. (2000). **The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells.** *J. Cell Biol.*, **149**: 317-329.
- Pines J. (1999). **Four-dimensional control of the cell cycle.** *Nature Cell Biol.*, **1**: E73-E79.
- Pines. J. & Hunter, T. (1991). **Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport.** *J. Cell Biol.*, **115**: 1-17.
- Powers, J., Bossinger, O., Rose, D., Strome, S. & Saxton W. (1998). **A nematode kinesin required for cleavage furrow advancement.** *Curr. Biol.*, **8**: 1133-1136.
- Prokopenko, S. N., Saint, R. & Bellen, H. J. (2000). **Untying the Gordian knot of cytokinesis. Role of small G proteins and their regulators.** *J. Cell Biol.*, **148**: 843-848.
- Racki, W. J., Becam, A. M., Nasr, F. & Herbert, C. J. (2000). ***Cbk1p*, a protein similar to the human myotonic dystrophy kinase, is essential for normal morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*.** *EMBO J.*, **19**:4524-4532.
- Riento, K. & Ridley, A. J. (2003). **Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour.** *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **4**:446-456.

- Salimova, E., Sohrmann, M., Fournier, N. & Simanis V. (2000). **The *S. pombe* orthologue of the *S. cerevisiae* *mob1* gene is essential and functions in signalling the onset of septum formation.** *J. Cell Sci.*, **113**:1695-1704.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001). **Molecular Cloning, A laboratory manual.** Third edition, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sampson, A. D., Wang, M. & Matunis, M. J. (2001). **The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification.** *J. Biol. Chem.*, **276**: 21664-21669.
- Schmidt, S., Sohrmann, M., Hofmann, K., Woollard, A. & Simanis, V. (1997). **The Spg1p GTPase is an essential, dosage-dependent inducer of septum formation in *Schizosaccharomyces pombe*.** *Genes & Dev.*, **11**:1519-1534.
- Shannon, K. B. & Li, R. (2000). **A myosin light chain mediates the localization of the budding yeast IQGAP-like protein during contractile ring formation.** *Curr. Biol.*, **10**:727-730.
- Shannon, K. B. & Li, R. (1999). **The multiple roles of Cyk1p in the assembly and function of the actomyosin ring in budding yeast.** *Mol. Biol. Cell*, **10**: 283-296.
- Sharp, D. J., Brown, H. M., Gregory, M. K., Rogers, G. C., Holland, G., & Scholey, J. M. (2000). **Functional coordination of three mitotic motors in *Drosophila* embryos.** *Mol. Biol. Cell*, **11**: 241-253.
- Sharp, D. J., Yu, K. R., Sisson, J. C., Sullivan, W., & Scholey, J. M. (1999). **Antagonistic microtubule-sliding motors position mitotic centrosomes in *Drosophila* early embryos.** *Nature Cell Biol.*, **1**: 51-54.
- Shou, W., Azzam, R., Chen, S.L., Huddleston, M.J., Baskerville, C., Charbonneau, H., Annan, R.S., Carr, S.A. & Deshaies, R.J. (2002). **Cdc5 influences phosphorylation of Net1 and disassembly of the RENT complex.** *BMC Mol. Biol.*, **3**:3.
- Shou, W., Seol, J. H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z. W., Jang, J., Shevchenko, A., Charbonneau, H. & Deshaies, R. J. (1999). **Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex.** *Cell*, **97**: 233-244.
- Simanis, V. (2003a). **The mitotic exit and septation initiation networks.** *J. Cell Sci.*, **116**: 4261-4262.
- Simanis, V. (2003b). **Events at the end of mitosis in the budding and fission yeasts.** *J. Cell Sci.*, **116**:4263-4275.
- Skibbens, R. V. & Hieter, P. (1998). **Kinetochores and the checkpoint mechanism that monitors for defects in the chromosome segregation machinery.** *Annu. Rev. Genet.*, **32**: 307-337.
- Smits, V. A. & Medema, R.H. (2001). **Checking out the G(2)/M transition.** *Biochim Biophys Acta.*, **1519**:1-12.
- Sohrmann, M., Schmidt, S., Hagan, I. & Simanis, V. (1998). **Asymmetric segregation on spindle poles of the *Schizosaccharomyces pombe* septum-inducing protein kinase Cdc7p.** *Genes & Dev.*, **12**:84-94.
- Song, S., Grenfell, T. Z., Garfield, S., Erikson, R. L. & Lee K. S. (2000). **Essential function of the polo box of Cdc5 in subcellular localization and induction of cytokinetic structures.** *Mol. Cell Biol.*, **20**:286-298.
- Sparks, C. A., Morphew, M. & McCollum, D. (1999). **Sid2p, a spindle pole body kinase that regulates the onset of cytokinesis.** *J. Cell Biol.*, **146**:777-790.

- Spector, D. L., Goldman, R. D., & Leinwand, L. A. (1998). **Cells. A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory .
- Spencer, S., Dowbenko, D., Cheng, J., Li, W., Brush, J., Utzig, S., Simanis, V. & Lasky, L. A. (1997). **PSTPIP: a tyrosine phosphorylated cleavage furrow-associated protein that is a substrate for a PEST tyrosine phosphatase**. *J. Cell Biol.*, **138**: 845-860.
- Stavridi, E. S., Harris, K. G., Huyen, Y., Bothos, J., Verwoerd, P. M., Stayrook, S. E., Pavletich, N. P., Jeffrey, P. D. & Luca, F. C. (2003). **Crystal structure of a human Mob1 protein: toward understanding Mob-regulated cell cycle pathways**. *Structure*, **11**:1163-1170.
- Stegmeier, F., Visintin, R. & Amon, A. (2002). **Separase, polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase**. *Cell*, **108**:207-220.
- St John, M. A., Tao, W., Fei, X., Fukumoto, R., Carcangiu, M. L., Brownstein, D. G., Parlow, A. F., McGrath, J. & Xu, T. (1999). **Mice deficient of Lats1 develop soft-tissue sarcomas, ovarian tumours and pituitary dysfunction**. *Nat. Genet.*, **21**:182-186.
- Straight, A. F. & Field, C. M. (2000). **Microtubules, membranes and cytokinesis** *Curr. Bio.*, **10**:R760- R770.
- Stucke, V. M., Sillje, H. H., Arnaud, L., Nigg, E.A. (2002). **Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication**. *EMBO J.*, **21**: 1723-1732.
- Sweeney, C., Murphy, M., Kubelka, M., Ravnik, S. E., Hawkins, C. F., Wolgemuth, D. J. & Carrington, M. (1996). **A distinct cyclin A is expressed in germ cells in the mouse**. *Development*, **122**: 53-64.
- Tamaskovic, R., Bichsel, S. J. & Hemmings, B. A. (2003). **NDR family of AGC kinases--essential regulators of the cell cycle and morphogenesis**. *FEBS Lett.*, **546**:73-80.
- Tanaka, K., Petersen, J., MacIver, F., Mulvihill, D. P., Glover, D.M. & Hagan, I. M. (2001). **The role of Plo1 kinase in mitotic commitment and septation in *Schizosaccharomyces pombe***. *EMBO J.*, **20**:1259-1270.
- Tanaka, T. U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M. J., & Nasmyth, K. (2002). **Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections**. *Cell*, **108**:317-329.
- Tao, W., Zhang, S., Turenchalk, G. S., Stewart, R. A., St John, M. A., Chen, W. & Xu, T. (1999). **Human homologue of the *Drosophila melanogaster* lats tumour suppressor modulates CDC2 activity**. *Nat. Genet.*, **21**:177-181.
- Tominaga, T., Sahai, E., Chardin, P., McCormick, F., Courtneidge, S. A., Alberts, A. S. (2000). **Diaphanous-related formins bridge Rho GTPase and Src tyrosine kinase signaling**. *Mol. Cell*, **5**: 13-25.
- Tran, P. T., Marsh, L., Doye, V., Inoue, S. & Chang, F. (2001). **A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing**. *J. Cell Biol.*, **153**: 397-411.
- Uhlmann, F., Lottspeich, F. & Nasmyth, K. (1999). **Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1**. *Nature*, **400**: 37-42.
- Waller, B. J. & Alberts, A. S. (2003). **The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton**. *Trends Cell Biol.*, **13**: 435-446.

- Wang, H., Oliferenko, S. & Balasubramanian, M. K. (2003). **Cytokinesis: relative alignment of the cell division apparatus and the mitotic spindle.** *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**: 82-87.
- Weiss, E. L., Kurischko, C., Zhang, C., Shokat, K., Drubin, D. G. & Luca, F. C. (2002). **The *Saccharomyces cerevisiae* Mob2p-Cbk1p kinase complex promotes polarized growth and acts with the mitotic exit network to facilitate daughter cell-specific localization of Ace2p transcription factor.** *J. Cell Biol.*, **158**:885-900.
- Weiss, E. & Winey, M. (1996). **The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene Mps1 is part of a mitotic checkpoint.** *J. Cell Biol.*, **132**: 111-123.
- Williams, B. C., Riedy, M. F., Williams, E. V., Gatti, M. & Goldberg, M. L. (1995). **The *Drosophila* kinesin-like protein KLP3A is a midbody component required for central spindle assembly and initiation of cytokinesis.** *J. Cell Biol.*, **129**: 709-723.
- Wittmann, T., Hyman, A. & Desai, A. (2001). **The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors.** *Nature Cell Biol.*, **3**: E28-E34.
- Wittmann, T. & Waterman-Storer, C. M. (2001). **Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way?** *J. Cell Sci.*, **114**: 3795-3803.
- Wu, J. Q., Kuhn, J. R., Kovar, D. R. & Pollard, T. D. (2003). **Spatial and temporal pathway for assembly and constriction of the contractile ring in fission yeast cytokinesis.** *Dev. Cell*, **5**: 723-734.
- Wu, Y., Dowbenko, D. & Lasky L. A. (1998). **PSTPIP 2, a second tyrosine phosphorylated, cytoskeletal-associated protein that binds a PEST-type protein-tyrosine phosphatase.** *J. Biol. Chem.*, **273**: 30487-30496.
- Vasquez, R. J., Gard, D. L. & Cassimeris, L. (1999). **Phosphorylation by CDK1 regulates XMAP215 function in vitro.** *Cell Motil. Cytoskeleton*, **43**: 310-321.
- Visintin, R., Craig, K., Hwang, E. S., Prinz, S., Tyers, M. & Amon, A. (1998). **The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation.** *Mol. Cell*, **2**: 709-718.
- Visintin, R., Hwang, E. S. & Amon, A. (1999). **Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus.** *Nature*, **398**:818-823.
- Xia, H., Qi, H., Li, Y., Pei, J., Barton, J., Blackstad, M., Xu, T. & Tao, W. (2002). **LATS1 tumor suppressor regulates G2/M transition and apoptosis.** *Oncogene*, **21**:1233-1241.
- Xu, S., Huang, H. K., Kaiser, P., Latterich, M. & Hunter T. (2000). **Phosphorylation and spindle pole body localization of the Cdc15p mitotic regulatory protein kinase in budding yeast.** *Curr. Biol.*, **10**:329-332.
- Yamashiro, S., Totsukawa, G., Yamakita, Y., Sasaki, Y., Madaule, P., Ishizaki, T., Narumiya, S. & Matsumura, F. (2003). **Citron kinase, a Rho-dependent kinase, induces di-phosphorylation of regulatory light chain of myosin II.** *Mol. Biol. Cell*, **14**: 1745-1756.
- Yam, C. H., Fung, T. K. & Poon, R. Y. (2002). **Cyclin A in cell cycle control and cancer.** *Cell Mol. Life Sci.*, **59**:1317-1326.
- Yang, R., Morosetti, R. & Koeffler, H. P. (1997). **Characterization of a second human cyclin A that is highly expressed in testis and in several leukemic cell lines.** *Cancer Res.*, **57**:913-920.
- Yasui, Y., Urano, T., Kawajiri, A., Nagata, K. I., Tatsuka, M., Saya, H., Furukawa, K., Takahashi, T., Izawa, I. & Inagaki, M. (2004). **Autophosphorylation of a newly identified site of Aurora-B is indispensable for cytokinesis.** *J. Biol. Chem.*, (in press).

- Yoshida, S. & Toh-e, A. (2001). **Regulation of the localization of Dbf2 and mob1 during cell division of *saccharomyces cerevisiae*.** *Genes Genet. Syst.*, **76**:141-147.
- Zou, H., McGarry, T. J., Bernal, T. & Kirschner M. W. (1999). **Identification of a Vertebrate Sister-Chromatid Separation Inhibitor Involved in Transformation and Tumorigenesis.** *Science*, **285**: 418-422.

11. APÊNDICES

11.1 Apêndice 1:

Comparação entre as proteínas Mob1 de *S. cerevisiae*, hsMob4A e hsMob4B

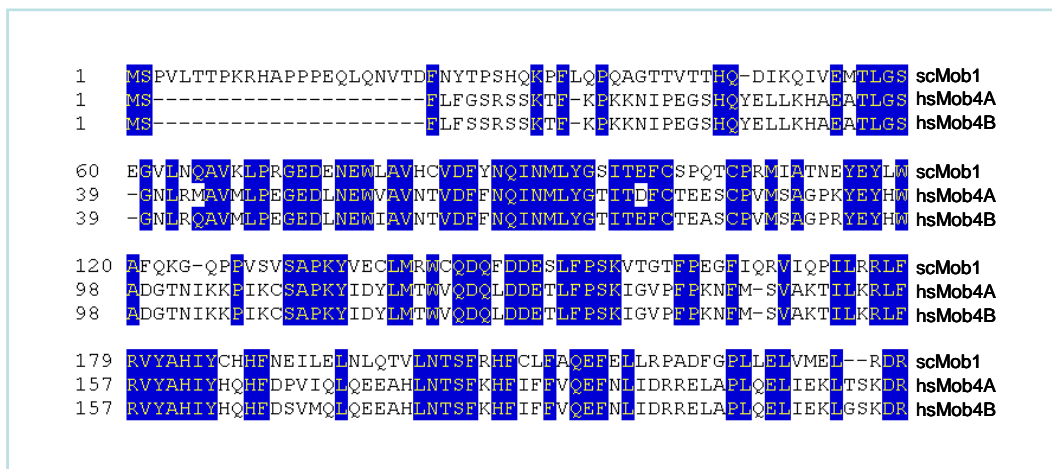


Figura 11.1 – Alinhamento entre as sequências das proteínas hsMob4A, hsMob4B e scMob1. A azul indicam-se os aminoácidos exactamente iguais a scMob1.

	hsMob4A	hsMob4B
ScMob1	43.1	44.0

Tabela 11.1 – Percentagem de identidade existente entre as proteínas hsMob4A e hsMob4B com a proteína scMob1 de *S. cerevisiae*.

11.2 Apêndice 2:

hsMob1 e hsMob3

Este projecto iniciou-se com a clonagem dos genes da família tipo Mob humanos. Com o decorrer do trabalho, o estudo focou-se principalmente nos genes hsMob4A e hsMob4B, como descrito nos capítulos de resultados. No entanto, e antes da decisão de se focar o estudo nos genes hsMob4, obtiveram-se alguns resultados preliminares no estudo dos genes hsMob1 e hsMob3 que se apresentam de seguida.

11.2.1 hsMob1

Para produzir um soro anti-hsMob1 injectou-se um coelho com a proteína hsMob1 expressa em bactéria e purificada por coluna de afinidade (Figura 11.2).

Verificou-se que o soro obtido (designado de ACR7) tem a capacidade de reconhecer, em Western Blot, a proteína hsMob1 expressa em bactéria e a Dmob1 de *Drosophila* (a identidade entre a hsMob1 e a Dmob1 é de 79,4%) (Figura 11.3). A utilização deste mesmo soro em extractos de HeLa não foi conclusiva, tendo os estudos que ser concluídos.

A sequência codificante de hsMob1 foi clonada em fusão com YFP no vector de expressão em células de mamíferos pEYFPC1, sendo o clone designado de dCF46. A análise temporal de células (HeLa e Hep-2) transfectadas com pEYFP.hsMob1 revelou que a sobreexpressão da proteína de fusão induzia morte celular (Figura 11.4). Como se pode observar na figura 11.4A o número de células HeLa transfectadas com YFP.hsMob1 diminui com o tempo, sendo ao fim de 5 dias negligível. Por outro lado, as células quando expressam apenas a proteína YFP apresentam-se saudáveis e o número de células fluorescentes aumenta quase exponencialmente ao longo do tempo. O mesmo resultado foi obtido com células Hep-2 (figura 11.4B).

Analisou-se também o fenótipo das células a expressarem YFP.hsMob1. Transfectaram-se células HeLa com dCF46, estas foram fixadas dois dias após transfecção e sendo o DNA corado com DAPI. Os resultados, ainda muito preliminares pois terão que ser repetidos, indicam que muitos dos núcleos das células que expressavam a proteína de fusão tinham constrições (figura 11.5, painéis C, F e I), sugerindo que a sobreexpressão de hsMob1 causa problemas de cariocinese. As células não transfectadas (figura 11.5, painel I seta azul), ou transfectadas apenas com o vector que expressa YFP não apresentam essas constrições no DNA.

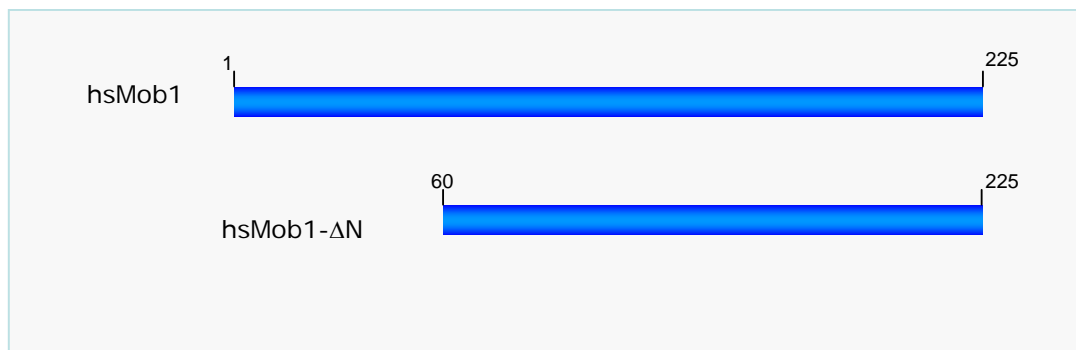


Figura 11.2 – Representação esquemática da proteína *hsMob1-ΔN* que se injectou no coelho para produzir anticorpos. O anticorpo foi produzido contra 2/3 da região C-terminal de *hsMob1*.

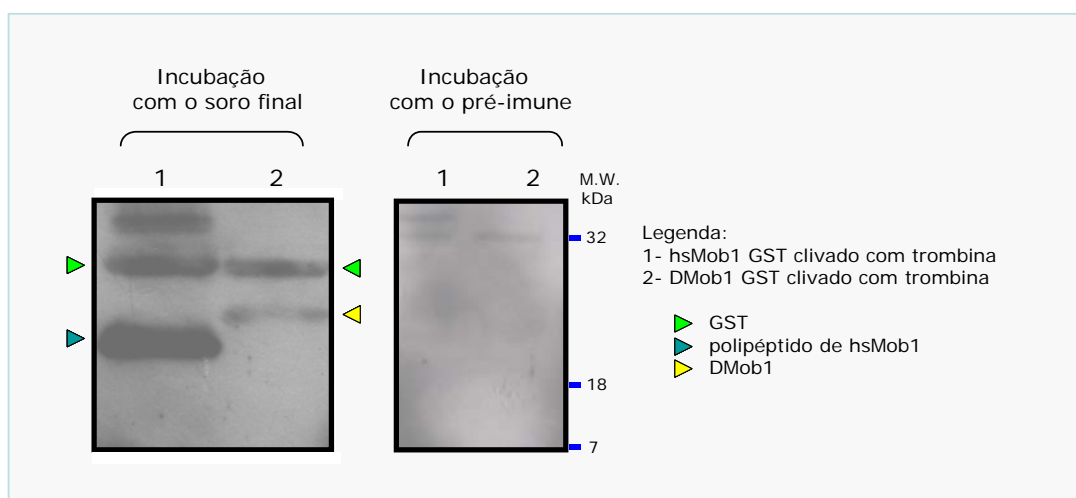


Figura 11.3 – O soro produzido contra *hsMob1* reconhece as proteínas *hsMob1* e *Dmob1* produzidas em bactéria. Apresenta-se um Western Blot com o soro anti-*hsMob1* (esquerda) e com o soro pré imune (direita). No gel aplicaram-se as amostras das proteínas *hsMob1* e *Dmob1* produzidas em bactérias (em fusão com GST) e subsequentemente purificadas e clivadas.

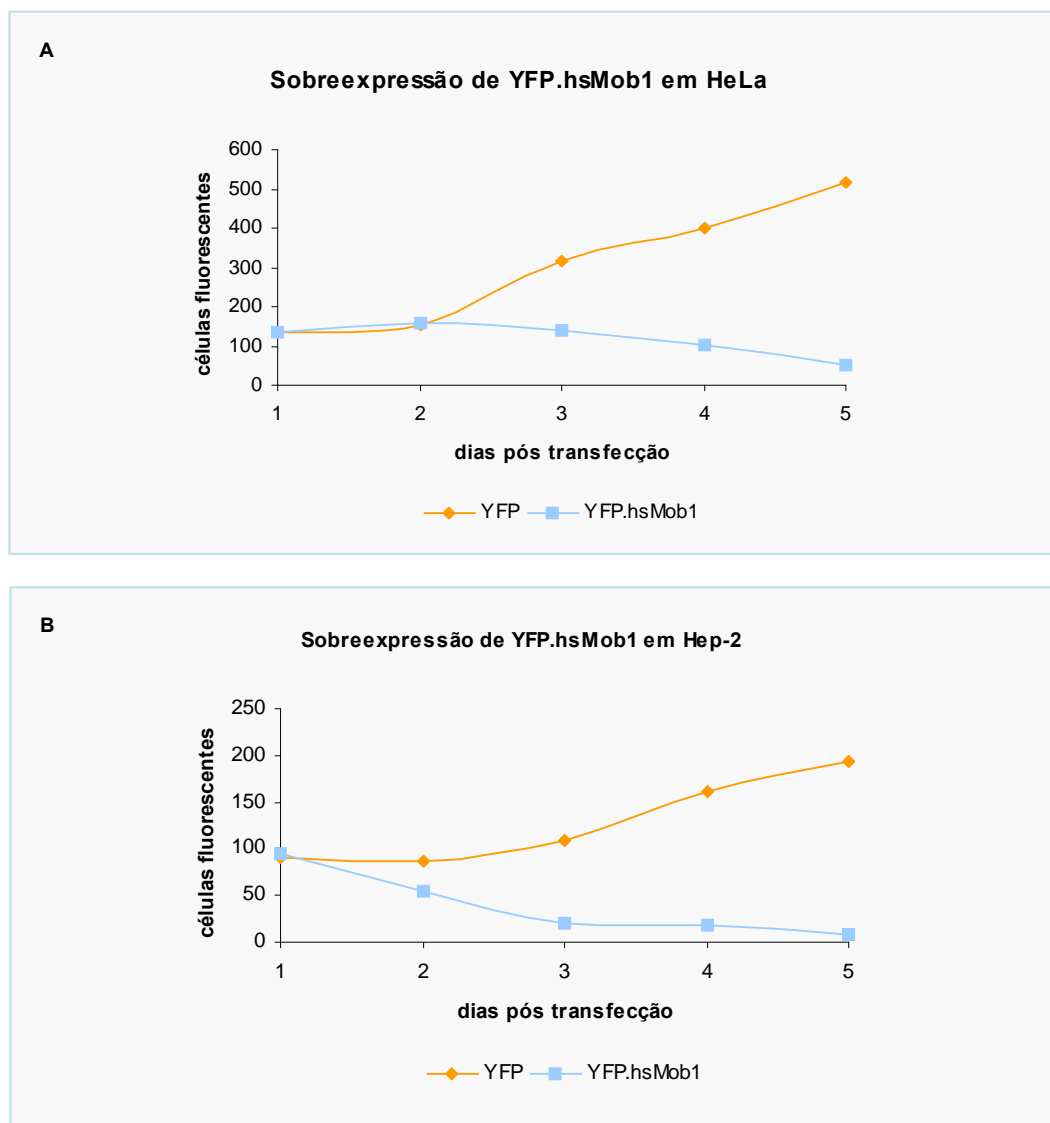


Figura 11.4 – A sobreexpressão de YFP.hsMob1 causa morte celular em células HeLa e em células Hep-2. A) Sobreexpressão de YFP.hsMob1 em células HeLa B) Sobreexpressão de YFP.hsMob1 em células Hep-2. (Estas experiências foram repetidas duas vezes)

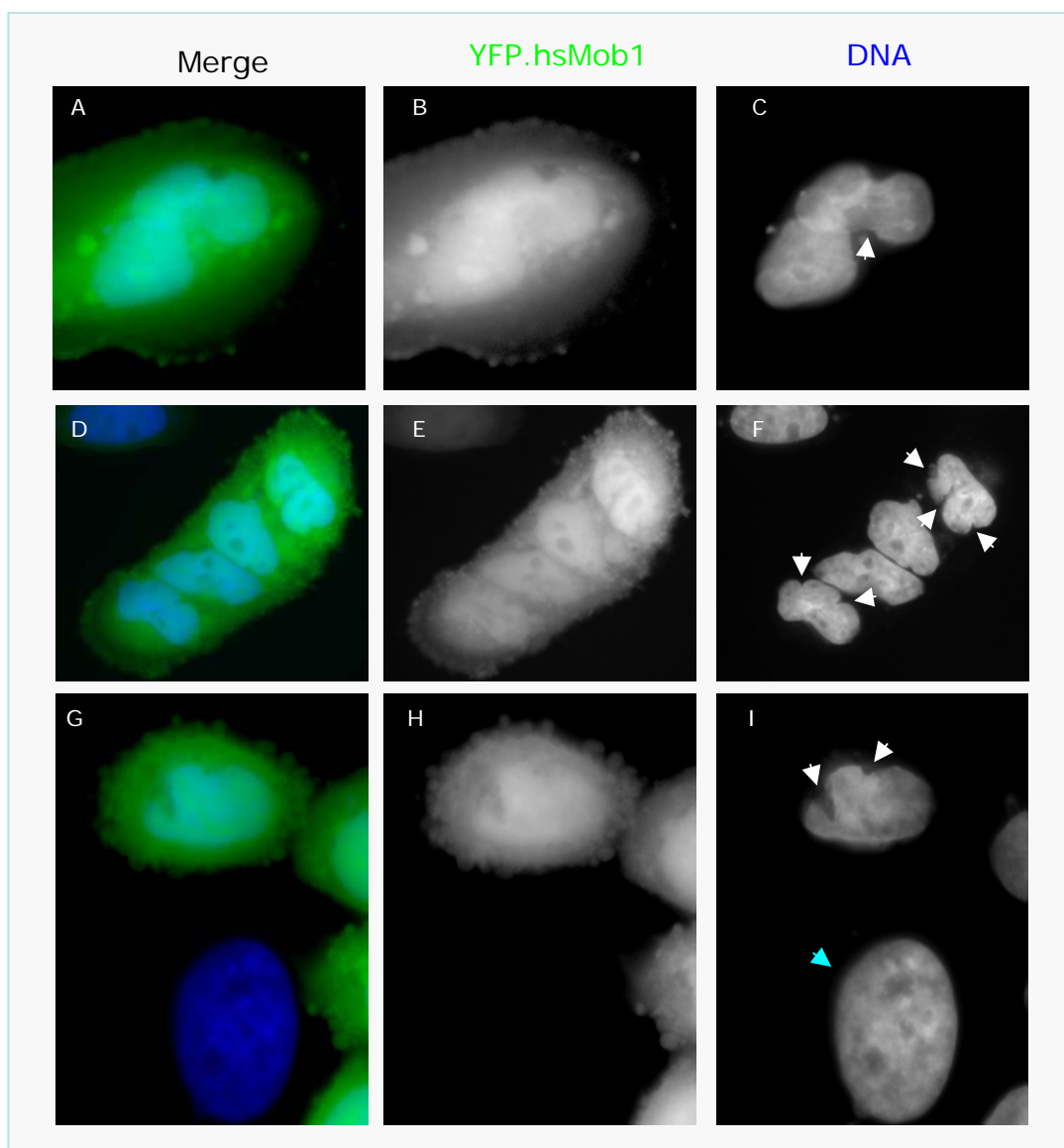


Figura 11.5 – A sobreexpressão da proteína de fusão YFP.hsMob1 em células HeLa afecta a cariocinese. As células HeLa foram transfectadas com 1 μ g de dCF46 e fixadas 2 dias pós transfecção. A azul observa-se o DNA (corado com DAPI) e a verde a proteína de fusão (YFP.hsMob1). As setas brancas indicam as constrições no DNA que se observam nas células que expressão YFP.hsMob1, a seta azul indica uma célula que não está transfectada (painel G) e que não tem constrições no DNA (painel I).

Desenhou-se um oligo de RNA específico contra hsMob1 (Oli5) (de forma a realizarem-se estudos funcionais de hsMob1), testou-se a sua eficácia mas não se fizeram, até ao momento, qualquer análises fenotípica dos efeitos da deplecção deste gene.

11.2.2 hsMob3

Realizaram-se ainda ensaios de imunofluorescência com anticorpos anti-Mob3. Estes anticorpos tinham sido criados contra a proteína de *Drosophila melanogaster* Dmob3, pelo Doutor Álvaro Tavares antes do início da realização deste trabalho. Após a determinação por Western Blot que estes anticorpos reconheciam a proteína hsMob3A produzida em bactéria, realizaram-se ensaios de imunofluorescência em células HeLa.

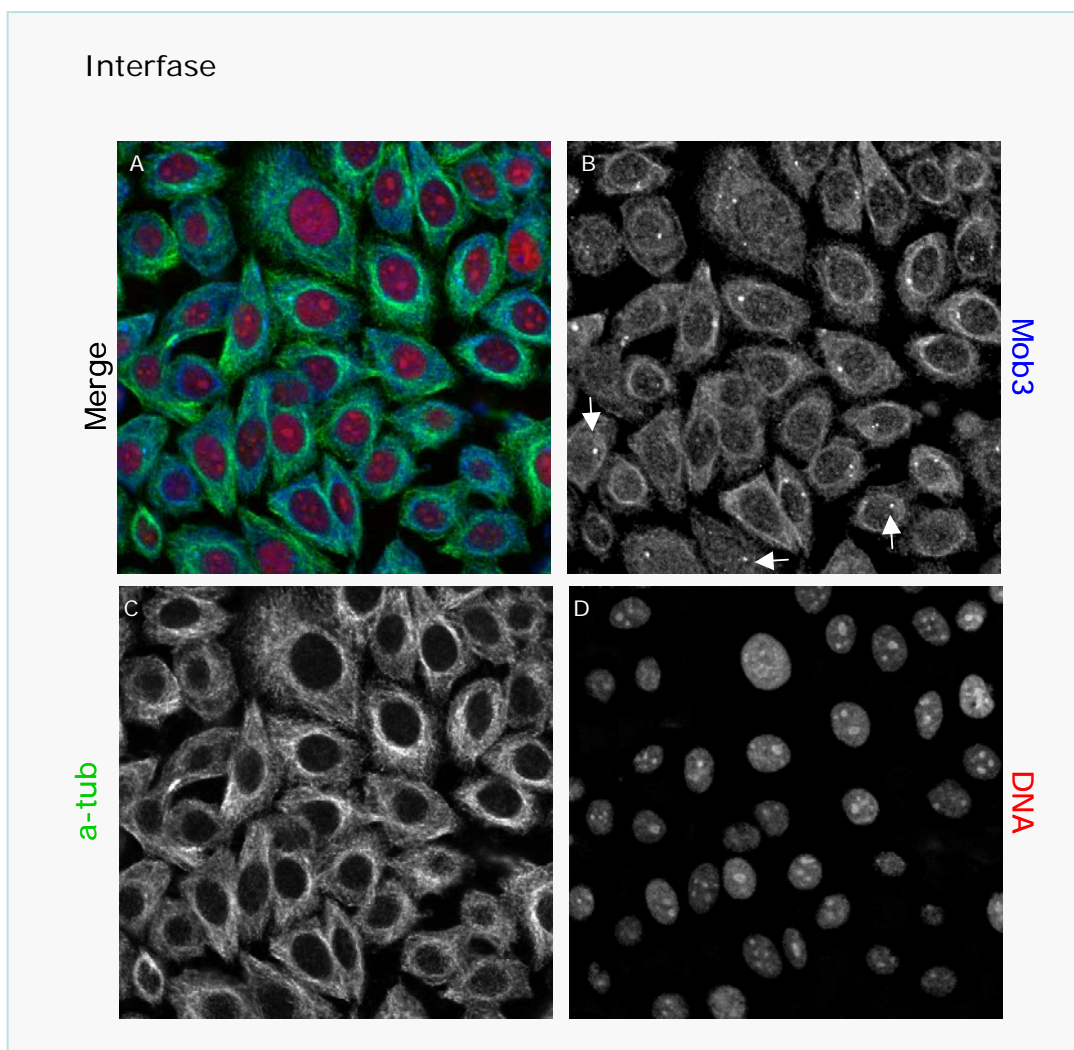


Figura 11.7 – Detecção de hsMob3 em células HeLa. As células foram fixadas com metanol e analisadas por imunofluorescência. Apresenta-se o α -tubulina a verde, o Mob3 a azul e o DNA a vermelho. As setas destacam alguns dos locais de acumulação de hsMob3 (possivelmente centrossomas) .

Utilizando-se o soro ACR1 (anti-DMOB3) observou-se uma marcação em pontos discretos no citoplasma de células interfásicas (Figura 11.7), nos polos do fuso durante as fases da mitose (figura 11.8 setas brancas), e no midbody em telofase (figura 11.8 seta

amarela). Estes resultados sugeriram que a hsMob3 se acumula nos centrôssomas. Para confirmar essa hipótese realizaram-se imunofluorescências duplas com o soro ACR1 e anticorpo anti- γ -tubulina. Observou-se que hsMob3 se acumula realmente nos centrôssomas durante todo o ciclo celular (figura 11.9). Obtiveram-se ainda resultados idênticos com o soro ACR3, que é um segundo soro de coelho gerado contra a proteína DMob3.

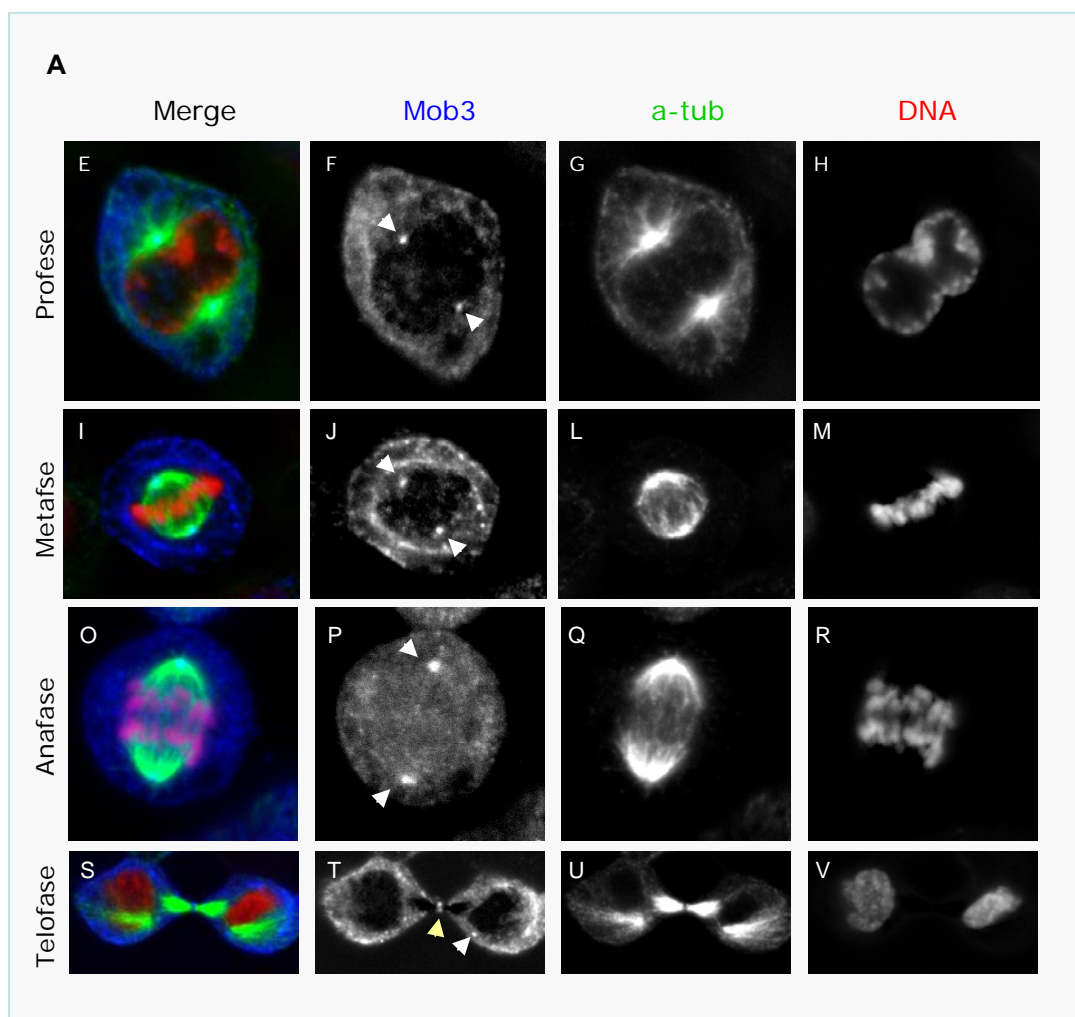


Figura 11.8 – Detecção de hsMob3 por imunofluorescência durante a mitose. Apresenta-se a α -tubulina a verde, o Mob3 a azul e o DNA a vermelho. Em profase, metafase e anafase pode observar-se hsMob3 nos polos do fuso (setas brancas). Em telofase observa-se hsMob3 no midbody (seta amarela) e na extremidade dos microtúbulos (sendo possivelmente o centrôssoma, seta branca).

I

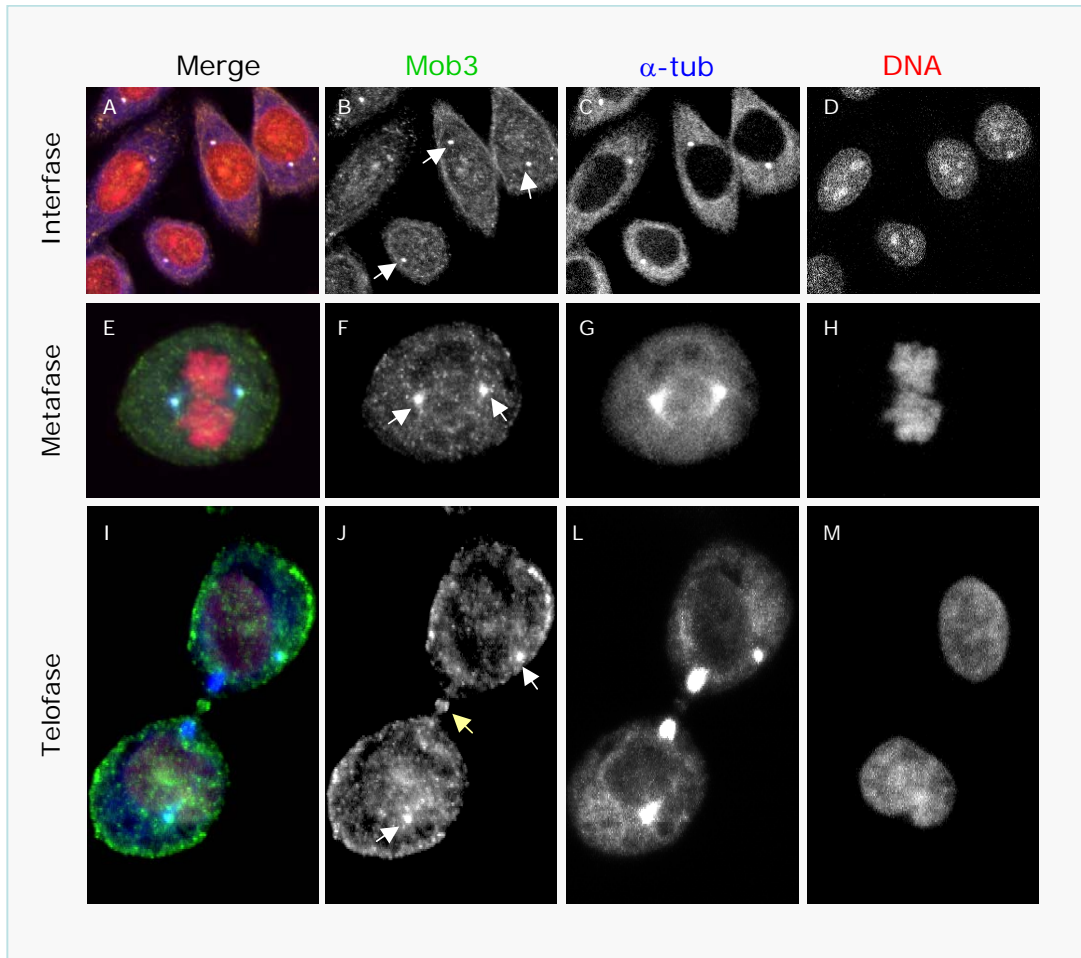
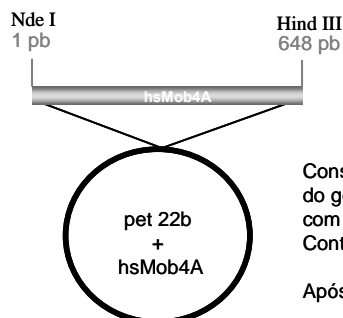


Figura 11.9 – Detecção de *hsMob3* em células *HeLa*. Apresenta-se a γ -tubulina a verde, o Mob3 a azul e o DNA a vermelho. As setas brancas indicam a acumulação de *hsMob3* nos centríolos, a seta amarela indica acumulação de *hsMob3* no midbody.

11.3 Apêndice 3:

Clones

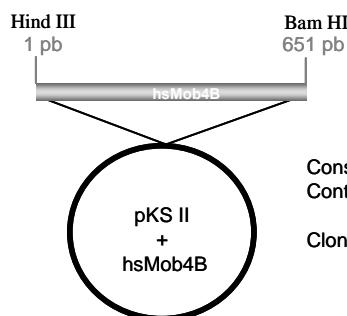
dCF28 – hsMob4A em pet22b



Construído por PCR do clone do ATCC número 178726 (número de acesso do gene bank AA 373302, que contém o cDNA completo de hsMob4A) com os primers InCF10 e InCF9. Contém toda a região codificante de hsMob4A e, retirou-se o codão STOP.

Após indução de bactérias BL21 obtém-se a proteína hsMob4A.6His

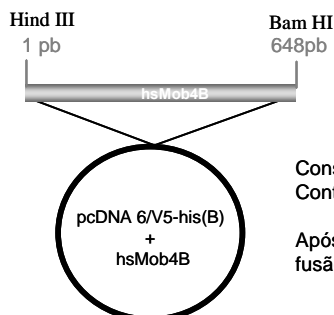
dCF35 – hsMob4B em pKS II



Construído por RT-PCR de RNA de HeLa com os primers InCF 17 e InCF18. Contém a região codificante completa de hsMob4B.

Clonado nos locais Hind III e Bam HI de pKS II.

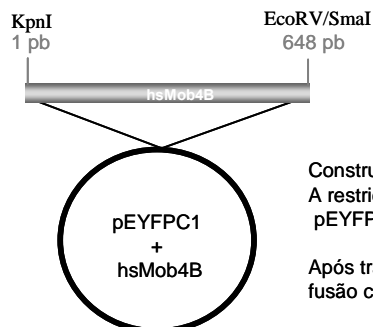
dCF36 – hsMob4B em pcDNA 6/V5-His(B)



Construído por PCR do clone dCF35 com os primers InCF20/InCF21. Contém a região codificante completa de hsMob4B, retirou-se o codão STOP.

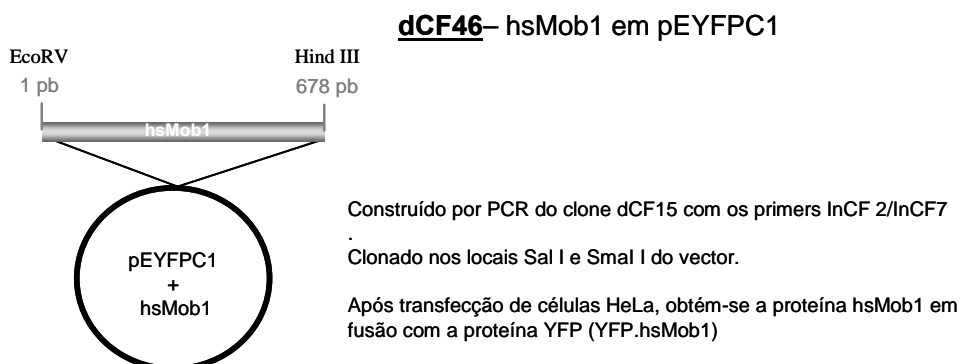
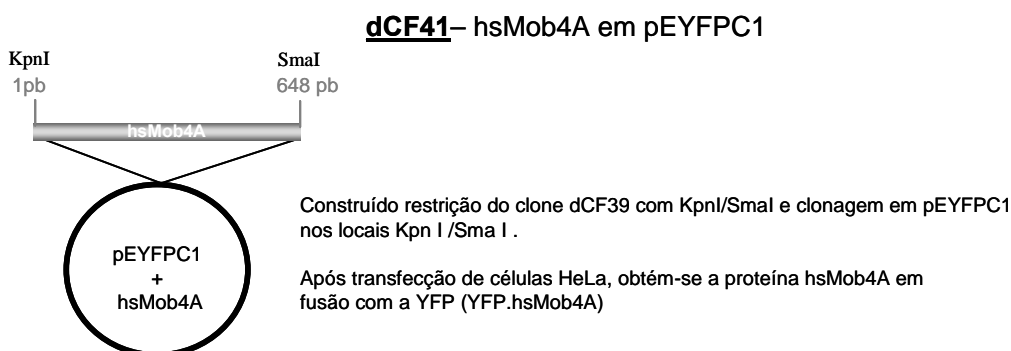
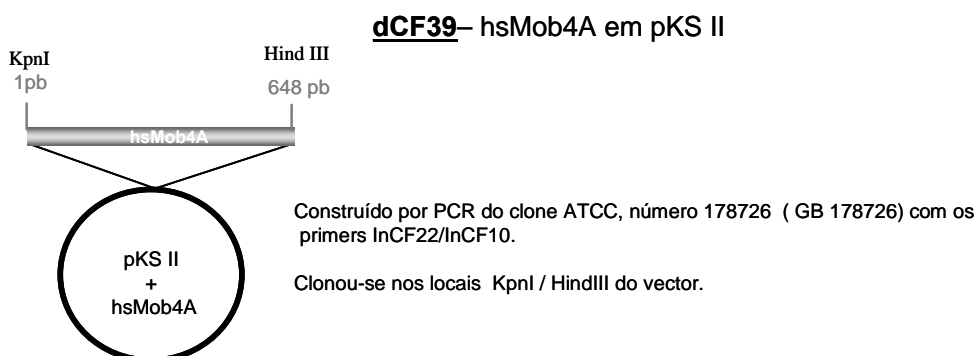
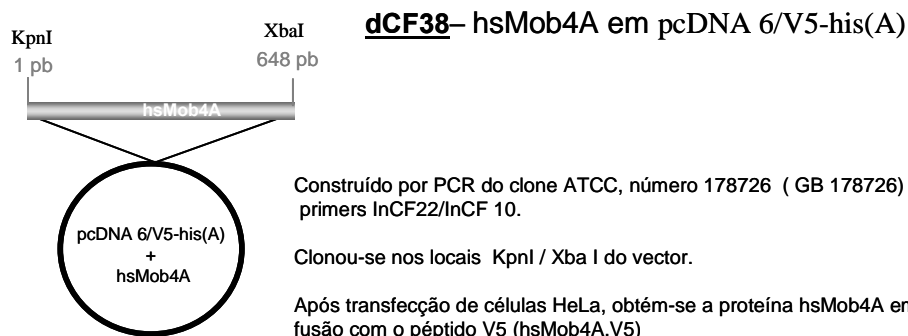
Após transfecção de células HeLa, obtém-se a proteína hsMob4B em fusão com o péptido V5 (hsMob4B.V5)

dCF37 – hsMob4B em pEYFPC1



Construído por PCR de dCF35 com os primers InCF20/InCF21. Fez-se A restrição do produto de PCR com KpnI/EcoRV e este foi clonado em pEYFPC1 nos locais KpnI / SmaI (perdeu-se o local Sma I deste vector).

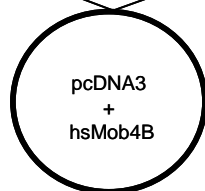
Após transfecção de células HeLa, obtém-se a proteína hsMob4B em fusão com a YFP (YFP.hsMob4B)



KpnI
1 pb

EcoRV
648 pb

hsMob4B



dCF47– hsMob4B em pcDNA3

Construído a partir do clone dCF36

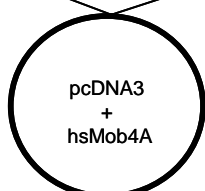
Clonado nos locais KpnI e EcoRV do vector

Após transfecção de células HeLa, obtém-se a proteína hsMob4B.

KpnI
1 pb

EcoRV
648 pb

hsMob4A



dCF48– hsMob4A em pcDNA3

Construído a partir do clone dCF38

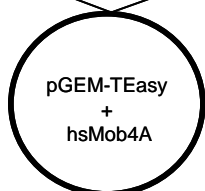
Clonado nos locais Kpn I e Xba I do vector

Após transfecção de células HeLa, obtém-se a proteína hsMob4A.

1 pb

651 pb

hsMob4A



dCF52– hsMob4A em pGEM-TEasy

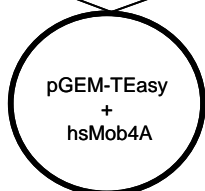
Construído a por PCR do clone dCF28 com os primers InCF26 e InCF25

O produto de PCR foi clonado directamente em pGEM-TEasey.

1 pb

651 pb

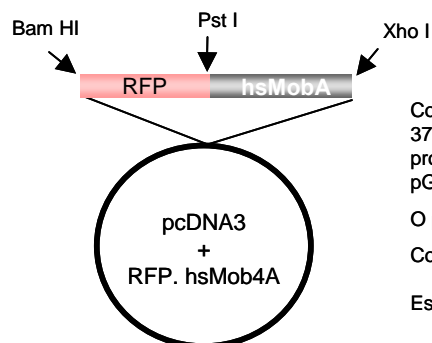
hsMob4B



dCF52– hsMob4A em pGEM-TEasy

Construído a por PCR do clone dCF28 com os primers InCF26 e InCF25

O produto de PCR foi clonado directamente em pGEM-TEasey.

RFP.hsMob4A – hsMob4A e RFP em pcDNA3.1

Construído por restrição do clone do ATCC número 178726 (AA 373302, cDNA completo de hsMob4A) com Pst I / Xho I. A este produto ligou-se a sequência de RFP, que estava clonada em pGEM-T easy no locais BamHI/PstI.

O produto desta ligação foi clonado em pcDNA3.

Contém toda a região codificante de hsMob4A.

Este clone foi construído por Joana Perdigão.

11.4 Apêndice 4:

Valores dos gráficos apresentados nos capítulos de resultados

11.4.1 Capítulo 5

	% de células com os centríolos separados
Células não tratadas	$3,8 \pm 1,2$
RNAi Lam A/C	$4,1 \pm 1,1$
RNAi Scramble duplex	$4,9 \pm 1,5$
RNAi hsMob4(A&B)	$26,8 \pm 3,9$

Tabela 11.2 – Percentagem de células com os centríolos separados. (Tabela com os valores apresentados na figura 5.4)

	Controlo	RNAi hsMob4(A&B)
0-0.5 μm	26.71 ± 5.39	11.65 ± 4.74
0.5-1 μm	42.09 ± 6.0	28.52 ± 5.96
1-1.5 μm	9.69 ± 1.22	12.29 ± 6.97
1.5-2 μm	3.68 ± 1.76	5.91 ± 2.32
>2 μm	17.75 ± 3.14	41.56 ± 3.27

Tabela 11.3 – Percentagem de células que se encontram com os referidos intervalos de separação de centríolos. (Tabela com os valores apresentados na figura 5.5)

	Scramble Duplex	RNAi de hsMob4(A&B)
[0,2]	12.24	10
[2,4]	67.34	20
[4,6]	18.36	31.66
[6,8]	2.04	18.33
>8	0	20

Tabela 11.4 – Intervalos de tempo de telofase até citocinese. (Tabela com os valores apresentados na figura 5.10). O máximo tempo observado para completar a citocinese foi para os controlos de 6,5 horas e para o RNAi de hsMob4(A&B) de 18 horas.

	Scramble duplex	RNAi (A&B)
0 vezes	74.14	8.25
1-5 vezes	22.41	28.86
6-10 vezes	3.45	35.05
> 10 vezes	0	27.83

Tabela 11.5 – Percentagem de células que variam o sentido de movimento após a depleção de *hsMob4(A&B)*. (Tabela com os valores apresentados na figura 5.22)

11.4.1 Tabelas referentes ao Capítulo 7

	RNAi controle	RNAi <i>hsMob4A</i>	RNAi <i>hsMob4B</i>	RNAi <i>hsMob4(A&B)</i>
Células binucleadas	1,9 ± 0.2	5,8 ± 1.1	2.5 ± 0.5	5.1 ± 0.6

Tabela 11.6 – A depleção de *hsMob4A* provoca um maior aumento de células binucleadas do que a depleção de *hsMob4B*, percentagem de células binucleadas. (Tabela com os valores apresentados na figura 7.1)

	RNAi controle	RNAi <i>hsMob4A</i>	RNAi <i>hsMob4B</i>	RNAi <i>hsMob4(A&B)</i>
Separação de centríolos	6,8 ± 1.2	8.1 ± 0.7	14 ± 0.7	25.7 ± 2.8

Tabela 11.7 – A depleção de *hsMob4B* provoca um maior aumento de células com os centríolos separados do que a depleção de *hsMob4A*, percentagem de com os centríolos separados. (Tabela com os valores apresentados na figura 7.2.)

Intervalos de tempo de telofase até citocinese			
	Scramble duplex %	<i>hsMo4A</i> %	<i>hsMob4B</i> %
0-2 h	12,2	1,6	7,5
2-4h	67,3	34,4	55
4-6 h	18,4	29,5	17,5
6-8 h	2,0	21,3	10
> 8	0	13,1	10

Tabela 11.8 – Depleção simples: intervalos de tempo de telofase até citocinese. (Tabela com os valores apresentados na figura 7.3 .) O máximo tempo observado para completar a citocinese foi para os controles de 6,5 horas, para o RNAi de *hsMob4A* de 21,8 horas e, para o RNAi de *hsMob4B* de 19,2 horas.

	Controlo	HsMob4A	hsMob4B	hsMob4(A&B)
0 vezes	74.1	25.8	12.1	8.2
1-5 vezes	22.4	40.9	46.5	28.9
6-10 vezes	3.4	27.3	34.5	35.0
>10 vezes	0	6.1	6.9	27.8

Tabela 11.9 – Percentagem de células que variam o sentido de movimento após a depleção de *hsMob4A* ou, *hsMob4B*. (Tabela com os valores apresentados na figura 7.4). Valores em percentagem.

	<i>Scramble duplex</i>	<i>hsMob4A</i>	<i>hsMob4B</i>	<i>hsMob4(A&B)</i>
0-10 $\mu\text{m/h}$	62.77	21.71	16.05	18.54
10-20 $\mu\text{m/h}$	21.28	27.40	26.76	30.13
20-30 $\mu\text{m/h}$	7.45	23.842	28.76	21.36
30-40 $\mu\text{m/h}$	5.32	13.17	15.38	13.41
>40 $\mu\text{m/h}$	3.19	13.88	13.04	16.56

Tabela 11.10 – A depleção de *hsMob4A* e de *hsMob4B* aumenta a velocidade instantânea das células. (Tabela com os valores apresentados na figura 7.5). Valores em percentagem.

	Velocidade máxima	Velocidade média
<i>Scramble duplex:</i>	70.34 $\mu\text{m/h}$	9,84 $\mu\text{m/h}$
<i>hsMob4A</i>	92,35 $\mu\text{m/h}$	23,54 $\mu\text{m/h}$
<i>hsMob4B</i>	130,34 $\mu\text{m/h}$	24,59 $\mu\text{m/h}$
<i>hsMob4(A&B)</i>	272.86 $\mu\text{m/h}$	26,24 $\mu\text{m/h}$

Tabela 11.11 – Tabela com os valores apresentados de velocidade máxima e média observados para o RNAi controlo, *hsMob4(A&B)*, *hsMob4A* e *hsMob4B*. (Tabela referente ao ponto 5.4 do capítulo 5 e ao ponto 7.4 do capítulo 7)